

Zeit- und polarisationsaufgelöste Multiphotonenspektroskopie und Mikroskopie von biologisch relevanten Molekülen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sebastian Herbrich

aus Schönebeck

1. Referent: Professor Dr. Karl-Heinz Gericke

2. Referent: Professor Dr. Peter Jomo Walla

eingereicht am: 17.03.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.06.2014

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

S. Herbrich, M. Gehder, R. Krull, K.-H. Gericke, *Label-Free Spatial Analysis of Free and Enzyme-Bound NAD(P)H in the Presence of High Concentrations of Melanin*, *Journal of Fluorescence*, 2012, **22**, 349.

P. S. Shternin, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, S. Denicke, S. Herbrich, K.-H. Gericke, *Dynamics of Two-Photon Two-Color Transitions in Fluorophores Excited by Femtosecond Laser Pulses*, *Proc. of SPIE*, 2012, **8553**, 85531A-1.

S. Herbrich, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, K.-H. Gericke, *Two-Color Two-Photon Excited Fluorescence of DMQ: Ab Initio Calculations and Experimental Determination of the Molecular Parameters*, *Journal of Physical Chemistry A*, accepted.

Internationale Programme und Berichte

S. Herbrich, *Time resolved translational and rotational molecular motion of biologically relevant molecules using femtosecond lasers*, G-RISC Project Number: C-2010a-1 (German-Russian Interdisciplinary Science Center, Sankt Petersburg, 28.08.2010 - 25.09.2010).

Tagungsbeiträge

S. Denicke, S. Herbrich, P. Shertin, A. G. Smolin, O. S. Vasyutinskii, K.-H. Gericke: *Complete polarization studies of UV-fluorophores by time resolved two-color two-photon excitation*. 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence (MAF 11), Budapest (2009).

S. Herbrich, S. Denicke, K.-H. Gericke: *Two-color two-photon microscopy: Simultaneous measurement of NAD(P)H and tryptophan fluorescence in MIN6-cells* 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence (MAF 11), Budapest (2009).

S. Herbrich, K.-H. Gericke: *Label-free spatial analysis of free and enzyme-bound NAD(P)H in Aspergillus Ochraceus* Shizuoka University International Symposium 2011 – Initiatives for Crossing Boundaries within Science and Technology, Shizuoka (2011).

S. Herbrich, K.-H. Gericke: *Time- and Polarisation-Resolved Two-Color Two-Photon Excitation of Indol* Summer School of Metrology, Burg Warberg (2012).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen	5
2.1 Über die Natur von elektronischen Übergängen	5
2.1.1 Zufällig orientierte Proben	11
2.1.2 Das Phänomen der Fluoreszenz	14
2.1.3 Die molekularen Parameter	16
2.2 Fluoreszenzlebensdauer.....	21
2.3 Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie	23
3. Materialien und Methoden	28
3.1 Materialien	28
3.2 Experimenteller Aufbau	30
3.2.1 Mikroskopaufbau für die Sporenmessungen	30
3.2.2 Aufbau für die Polarisationsmessungen.....	32
3.2.3 Polarisationschema.....	37
3.3 Analyse von Fluoreszenzdaten	38
3.3.1 Faltung der Signale	38
3.3.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer und Generierung einer Fluoreszenzbildes.....	41
3.3.3 Bestimmung der molekularen Parameter mit Hilfe polarisationsabhängiger Fluoreszenz .	42
4. Ergebnisse und Diskussion	46
4.1 Zweiphotonenmikroskopie von <i>Aspergillus Ochraceus</i>	46
4.1.1 Vergleich der Sporen nach ihrer Herkunft (Nährböden).....	52
4.1.2 Freies NAD(P)H	54
4.1.3 Enzymgebundenes NAD(P)H	55
4.1.4 Anteile der Fluoreszenz des enzymgebundenen NAD(P)H	56
4.1.5 Weitere FLIM-Messungen	58
4.2 Zweifarben-Zweiphotonen Messungen	61
4.2.1 2-Methyl-5-t-butyl-p-quaterphenyl(DMQ).....	61
4.2.2 Indol.....	73
4.2.3 Tryptophan und Tryptophanderivate.....	81
5 Zusammenfassung und Ausblick	94
5.1 Sporenmessungen.....	94
5.2 Polarisationsmessungen.....	98
6 Literaturverzeichnis	102
7 Appendix.....	105

1 Einleitung

Als isotrop wird ein System bezeichnet, wenn alle ihm innewohnenden Elemente geometrisch gleich verteilt sind. Von Anisotropie wird demnach gesprochen, wenn eine bevorzugte Ausrichtung eines Teils der Elemente des Systems vorliegt. Die Experimente in dieser Arbeit beschäftigen sich vorwiegend mit der Ausrichtung von biologisch relevanten Molekülen und den Schlussfolgerungen, die daraus abgeleitet werden können. Die Wechselwirkung zwischen polarisierter elektromagnetischer Strahlung und dem Übergangsdipolmoment von Molekülen bildet dabei die Grundlage der Versuche. Eine elektronische Anregung eines willkürlich ausgerichteten Moleküls wird bevorzugt dann stattfinden, wenn dessen Übergangsdipolmoment parallel zum elektrischen Feldvektor des einfallenden Lichtes steht. Da das Übergangsdipolmoment in Bezug auf die Molekülachse fest ausgerichtet ist, findet also eine Photos Selektion statt, wodurch nur ein bestimmt ausgerichteter Teil der Moleküle in einem System angeregt wird. Handelt es sich bei diesen Molekülen um Fluorophore, also Moleküle die nach einer elektronischen Anregung die überschüssige Energie wieder in Form von Licht und speziell in diesem Fall als Fluoreszenz wieder abgeben können, ist es möglich, das ausgesendete Licht zu untersuchen und zu charakterisieren. Sind diese Moleküle zusätzlich frei beweglich, wie zum Beispiel in einer Lösung, können sie rotieren bevor sie ihre Energie in Form von Fluoreszenz wieder aussenden. Diese Fluoreszenz verfügt ebenfalls über eine bestimmte Ausrichtung bezogen auf die Molekülachse und kann polarisationsabhängig detektiert werden. Daraus folgend ist es möglich, eine Aussage über den Winkel zwischen dem einfallendem und dem emittiertem Licht zu treffen, was äquivalent zur Anisotropie des untersuchten Systems ist.

Die spezielle Technik, mit der die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, ist die sogenannte Multiphotonenanregung. Erstmals im Jahre 1930 theoretisch beschrieben^[1], konnte die Multiphotonenanregung erst in den 60er Jahren technisch durch die Entwicklung von Rubinlasern realisiert werden^[2]. Darauf folgend wurden viele neue theoretische Arbeiten über polarisationsabhängige Multiphotonenanregungen mit anschließender Fluoreszenz verfasst. Einige der wichtigsten Pioniere auf diesem Gebiet sind McClain, Callis, Johnson und Wan, welche aufzeigen konnten wie sich die linearen Kombinationen der Elemente des Zweiphotonenabsorptionstensors experimentell bestimmen lassen^[3-5]. Desweiteren konnten sie die polarisierte Fluoreszenz von rotierenden Molekülen in Lösungen theoretisch beschreiben. Vor kurzem wurde ein neuer Ansatz zur Beschreibung der Multiphotonenanregung von

Vasyutinskii vorgestellt, welcher praxistaugliche Werkzeuge liefert, um die Messungen von Zweiphotonentensoren zu vereinfachen^[6]. Darauf basierend wurde in einer Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen um Prof. Vasyutinskii und Prof. Gericke eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe es möglich ist, Moleküle gezielt mit verschiedenen Polarisierungen anzuregen und anschließend deren Fluoreszenz polarisationsaufgelöst zu detektieren. Dazu ist es nötig zwei Photonen unterschiedlicher Energie und Polarisation nahezu gleichzeitig mit dem Zielmolekül wechselwirken zu lassen, was bislang in dieser Art und Weise einzigartig ist. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in dieser Arbeit im Kapitel 4.2 vorgestellt.

Viele weitere Anwendungen der Multiphotonenanregung wurden in den 90er Jahren durch die kommerzielle Verbreitung von Ti:Sa Lasern geschaffen, mit deren Hilfe Zweiphotonenanregungen Einzug in die Biowissenschaften hielten. Die Wichtigste ist nach wie vor die Zweiphotonenmikroskopie, welche von Denk und Webb ins Leben gerufen wurde^[7]. Danach folgte ein regelrechter Boom und zahlreiche neue Anwendungsgebiete der Multiphotonenmikroskopie wurden erschlossen^[8]. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Zweiphotonenmikroskopie von Pilzsporen. Noch nie zuvor wurden Pilzsporen mit der Zweiphotonenmikroskopie untersucht. Das Interesse an Pilzsporen als Forschungsobjekt wurde durch deren Einsatz in biotechnischen Verfahren geweckt. Trotz gleicher physikalischer Parameter in den Bioreaktoren wurden unterschiedlichen Ausbeuten der Reaktionen ermittelt. Die Arbeitsgruppe um Professor Krull am Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig untersuchte dieses Phänomen und entdeckte, dass die Lagerung der Sporen einen entscheidenden Beitrag leistet. Dabei ist vielmehr die Lagerung an sich von Bedeutung als die Bedingungen unter denen die Sporen gelagert werden. Professor Krull und Mitarbeiter versuchten mit unterschiedlichen Methoden den Grund dafür zu entdecken. Dies war der Anlass einer Zusammenarbeit zwischen den Arbeitsgruppen Krull und Gericke. Es sollte eine Methode entwickelt werden, die Sporen zu untersuchen und ihren Metabolismus einzuschätzen. Ein Problem stellt die dicke Zellwand der Sporen dar. Bis dahin musste diese aufgebrochen werden, um Informationen über das Innenleben der Spore zu erhalten. Der große Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie besteht darin, dass es möglich ist, die Spore in ihrem natürlichen Umfeld zu beobachten, ohne sie direkt zu verändern. Auch die Zellwand ist ohne Bedeutung für die Mikroskopie. Bislang war die Annahme verbreitet, dass sich die Sporen bis zu ihrer Aktivierung in einer Art Ruhemodus befinden und der Metabolismus der Sporen auf ein Minimum reduziert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen anderen Sachverhalt hin. Es existiert ein aktiver Metabolismus während der Lagerung und ein anderer während der

Keimung der Sporen. NAD(P)H (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) ist einer der wichtigsten Kofaktoren, welche an den Reaktionen des Metabolismus von Zellen beteiligt sind^[9, 10]. Das Verhältnis der Fluoreszenzlebensdauern von enzymgebundenem zu freiem NAD(P)H ist dabei ein Indikator für die Aktivität des Metabolismus. Kapitel 3 beschreibt die Methode, mit welcher es möglich ist, dieses Verhältnis quantitativ mikroskopisch zu ermitteln. Als Forschungsobjekt dient dazu die Spezies *Aspergillus Ochraceus*, ein Schimmelpilz welcher besondere Aufmerksamkeit durch seine Funktion in der biokatalytischen, enantioselektiven Hydroxylierung von Stereoiden, wie zum Beispiel dem Progesteron, gewonnen hat. Im Fokus stehen vor allem die Sporen des Pilzes, welche in der Industrie direkt im Bioreaktor ausgekeimt und zu Biomasse umgewandelt werden. Die Ergebnisse der Messungen werden im Kapitel 4.1 vorgestellt.

Desweiteren wird im Ergebnisteil die Analyse der intrinsischen Fluoreszenz der Pilzsporen vorgestellt. Allgemein ist die intrinsische bzw. natürliche Fluoreszenz in der Vergangenheit ein bedeutendes Werkzeug geworden, um die Eigenschaften einer Probe in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen^[11]. Die wichtigsten natürlichen Fluorophore für Zellen sind NAD(P)H, Retinol, Indolamine, Kollagen, Melanin und Chlorophyll^[12-16]. Allgemein können die Fluorophore anhand ihrer Absorption und Emission unterschieden werden. Dennoch ist es möglich, dass es hin und wieder zu einer Überlappung der Spektren kommt und eine spektroskopische Unterscheidung unmöglich wird. Beispielsweise absorbiert NAD(P)H Strahlung bei einer Wellenlänge im Bereich von 350 nm, was einer Überlappung mit dem Absorptionsspektrum von Melanin gleichkommt^[17]. Auch die Emission beider Moleküle liegt im gleichen spektralen Bereich, so dass sie nicht unterschieden werden können. Dennoch wird eine Unterscheidung möglich wenn ihre Fluoreszenzlebensdauern berücksichtigt werden. Es ist sogar möglich, zwischen freiem und enzymgebundenem NAD(P)H zu unterscheiden^[18]. Desweiteren ist es möglich morphologische Untersuchungen an biologischen Proben mit Hilfe der Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern durchzuführen, sollten die intrinsischen Fluorophore in bestimmten Bereichen der Probe verteilt sein^[19, 20]. Die vorgestellten Messungen zeigen, dass Melanin vorwiegend in der Zellwand der Sporen vorkommt, während NAD(P)H sich im Inneren befindet. Viel wichtiger ist jedoch die Erkenntnis, dass NAD(P)H nur in bestimmten Regionen vorkommt. Daraus folgend existiert eine Struktur und Organisation innerhalb der Spore, welche die Aktivität des Metabolismus steuert. Dieser Fakt ist bemerkenswert und komplett neu. Die Ergebnisse dieser Messungen befinden sich im Kapitel 4.1.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Zweiphotonenmikroskopie und Spektroskopie benutzt werden, um für unterschiedliche Fragestellungen neue Erkenntnisse zu gewinnen.

2. Theoretische Grundlagen

Im Folgenden werden einige theoretische Grundlagen besprochen, welche wichtig für das Verständnis der folgenden Experimente sind. Zunächst wird die Polarisierung von Strahlung als solche diskutiert. Daran anschließend wird der Hintergrund zu elektronischen Übergängen vermittelt, wobei auf die Rolle der Ausrichtung des Moleküls eingegangen wird. Desweiteren werden Multiphotonenprozesse und ihre theoretische Handhabung beschrieben.

Gegenstand des zweiten Teils ist die bildgebende Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer. Daran anschließend wird im dritten Teil die Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie erläutert.

2.1 Über die Natur von elektronischen Übergängen

In dieser Arbeit werden ausschließlich elektronische Übergänge betrachtet, welche durch eine Stimulation mithilfe von Licht realisiert werden. Dabei lassen sich alle Vorgänge auf die Interaktion von Licht mit den Elektronen der betrachteten Moleküle reduzieren. Außerdem steht der Wellencharakter des Lichts im Vordergrund, da Licht als eine elektromagnetische Welle verstanden wird. Diese Welle wird durch zwei Felder beschrieben, ein magnetisches und ein elektrisches, welche senkrecht zueinander stehen. Die Ausbreitung erfolgt senkrecht zu den beiden Feldvektoren, so dass von einer Transversalwelle gesprochen wird. Im Folgenden wird der elektrische Feldvektor im Vordergrund stehen, da er die Polarisierung der Photonen widerspiegelt.

Für die Beschreibung der Polarisierung von Licht ist es hilfreich, sich eine Welle vorzustellen, welche aus der Superposition zweier Wellen resultiert. Beträgt die Phasendifferenz zwischen den beiden Wellen 0° , so resultiert daraus eine linear polarisierte Welle. Wird die Phasendifferenz um plus bzw. minus 90° verschoben, entsteht eine links- bzw. rechtszirkular polarisierte Welle. Alle anderen Phasendifferenzen erzeugen elliptische Polarisierung, welche experimentell nur schwierig handhabbar sind. Polarisierte Wellen lassen sich gut mit der Freeware „EMANIM“ veranschaulichen. Die folgenden Abbildungen 2.1.a bis 2.1.d wurden mit Hilfe jener Freeware erstellt:

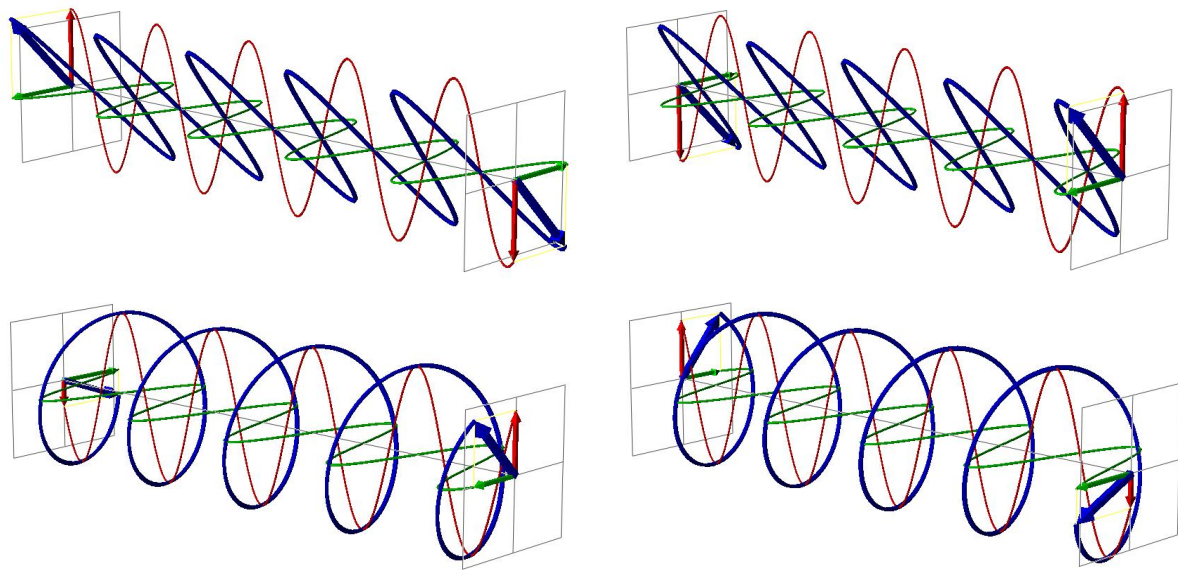


Abbildung 2.1.a-d: Gezeigt sind zwei Wellen (rot und grün) und die daraus resultierende Welle (blau). Die Ausbreitung erfolgt von links nach rechts. In den Fällen a und b beträgt die Phasendifferenz 0° , die resultierende Welle ist linear polarisiert. In den Fällen c und d beträgt die Phasendifferenz $+90^\circ$, die resultierende Welle ist linkszirkular polarisiert.

Mithilfe der vorangegangenen Betrachtungen ist es nun möglich den elektronischen Übergang eines Moleküls vom Grundzustand in einen angeregten Zustand zu beschreiben. Gleichung 2.1 zeigt das Übergangsintegral für einen Übergang vom Grundzustand o in den angeregten Zustand f^[3].

$$\mathbf{M}_{of} = \int \psi_o^*(r) \mathbf{r} \psi_f(r) d\tau_r \quad (2.1)$$

Dabei ist \mathbf{M}_{of} das Übergangsdipolmoment, ψ_o die Wellenfunktion des Grundzustandes, ψ_f die Wellenfunktion des Endzustandes und \mathbf{r} der Dipolmomentoperator. Werden alle Elemente von \mathbf{M}_{of} gleich Null, so ist der Übergang verboten und kann nicht stattfinden. Es ist möglich über einfache Symmetriebetrachtungen eine Vorrausage zu treffen, ob ein Übergang möglich ist oder nicht. Dazu ist es nötig, sowohl die Symmetrie des Grundzustandes als auch die des angestrebten angeregten Zustandes zu kennen. Desweiteren muss die Punktgruppe des untersuchten Moleküls bekannt sein. Dann kann mit Hilfe der Charaktertafeln, welche aus der Gruppentheorie resultieren, eine Vorhersage getroffen werden. Dies soll kurz an einem Beispiel veranschaulicht werden:

Tabelle 2.1: Charaktertafel für die Punktgruppe D_{2h} ^[21].

D_{2h}	E	$C_2(z)$	$C_2(y)$	$C_2(x)$	i	(xy)	(xz)	(yz)	lineare Funktion, Rotation	quadratische Funktion
A_g	1	1	1	1	1	1	1	1	-	x^2, y^2, z^2
B_{1g}	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	R_z	xy
B_{2g}	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	R_y	xz
B_{3g}	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	R_x	yz
A_u	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-	-
B_{1u}	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	z	-
B_{2u}	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	y	-
B_{3u}	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	x	-

Es soll ermittelt werden, ob der elektronische π - π^* -Übergang im Ethenmolekül erlaubt ist oder nicht. Da das Ethenmolekül drei Rotationsachsen, drei Spiegelebenen und ein Inversionszentrum besitzt, kann es der Punktgruppe D_{2h} zugeordnet werden. In Abbildung 2.2 ist die Charaktertafel für die Punktgruppe D_{2h} dargestellt. Nun müssen die Symmetrien der beiden Zustände untersucht werden. Der Ausgangszustand (π -Zustand) besitzt B_{3u} -Symmetrie und der Endzustand (π^* -Zustand) B_{2g} -Symmetrie. Dann wird das direkte Produkt der irreduziblen Darstellungen gebildet. Dazu werden alle Charaktere von B_{3u} und B_{2g} multipliziert, wodurch die Charaktere erhalten werden, welche der B_{1u} -Symmetrie entsprechen.

Tabelle 2.2: Das direkte Produkt der irreduziblen Darstellungen von B_{2g} und B_{3u} ergibt sich durch die Multiplikation der einzelnen Charaktere.

D_{2h}	E	$C_2(z)$	$C_2(y)$	$C_2(x)$	i	(xy)	(xz)	(yz)
B_{2g}	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
B_{3u}	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
$B_{2g} * B_{3u}$	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1

Tabelle 2.3: Das Ergebnis des direkten Produkts von B_{2g} und B_{3u} entspricht der irreduziblen Darstellung von B_{1u} und ist nur mit einem in z-Richtung orientierten Übergangsdipolmoment realisierbar.

D_{2h}	E	$C_2(z)$	$C_2(y)$	$C_2(x)$	i	(xy)	(xz)	(yz)	lineare Funktion
B_{1u}	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	z

Das Ergebnis ist, dass das Integral des Übergangs nur dann ungleich Null wird, also der Integrand totalsymmetrisch ist, wenn das Übergangsdipolmoment in z-Richtung, bezogen auf die Molekülkoordinaten, orientiert ist. Dieses Beispiel zeigt, dass der Übergang von einer g zu einer u Symmetrie mit einem Photon möglich ist. Ganz allgemein gilt aus Symmetriegründen die Paritätsregel, welche besagt, dass Einphotonenübergänge nur von g nach u oder u nach g möglich sind.

Durch die Paritätsregel bleiben viele interessante Übergänge wie g nach g oder u nach u im Verborgenen. Eine Lösung dieses Problems wurde erstmals von Maria Göppert-Mayer vorgestellt, als sie im Jahr 1930 ihre Dissertation mit dem Titel „Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“ veröffentlichte^[1]. In ihrer Arbeit postulierte sie die Möglichkeit der gleichzeitigen Absorption wie auch Emission von zwei Photonen. Ihre Überlegungen stützte sie auf die Diracsche Dispersionstheorie^[22]. Danach ergeben sich aus der quantenmechanischen Behandlung der Störungstheorie ersten Grades Terme, welche den physikalischen Prozessen von Absorption und Emission entsprechen. Aus der analogen Behandlung der Störungstheorie zweiten Grades resultieren dann die Prozesse der Transmission und Streuung, wobei die Streuung quantenmechanisch als gleichzeitige Auslöschung und Erschaffung zweier Photonen betrachtet wird. Besitzen diese beiden Photonen die gleiche Frequenz, wird von Rayleigh-Streuung gesprochen. Ist die Frequenz verschieden, wird von Raman-Streuung gesprochen. Göppert-Mayer erkannte als erste, dass es einen der Raman-Streuung sehr ähnlichen Prozess gibt: die simultane Emission zweier Photonen, welche jeweils die halbe Energie des Übergangs besitzen, die ursprünglich dem Übergang entsprechen würde. Damit lag es auch nahe, den umgekehrten Fall der simultanen Absorption zu beschreiben. Dabei wird angenommen, dass der finale Zustand $E_f = E_o + \hbar\omega_f$ nicht direkt durch ein Photon $\hbar\omega_1$ oder $\hbar\omega_2$ angeregt werden kann ($\hbar\omega_1 < \hbar\omega_f < \hbar\omega_2$), es aber trotzdem zur Wechselwirkung zwischen dem Molekül und den Photonen kommen kann. Dabei geht das Molekül in einen nichtstationären Zustand über. Dabei zu beachten ist, dass es sich um einen zeitabhängigen Zustand und nicht um einen energieabhängigen Zustand handelt. Aus diesem Grund wird die Energieerhaltung für sehr kurze Zeiten physikalisch irrelevant. Ermöglicht wird dies durch die Heisenberg'sche Unschärferelation bezüglich Energie und Zeit:

$$\Delta E \geq \frac{\hbar}{\Delta t} \quad (2.2)$$

Wie aus Gleichung 2.2 zu erkennen ist, wird für sehr kurze Zeiten die Energieunschärfe sehr groß. Nehmen wir einen energetischen Übergang bei einer Wellenlänge von 400 nm an und eine Unschärfe von ebenfalls 400 nm, dann beträgt die Zeitunschärfe:

$$\Delta t \approx \frac{\lambda}{c \cdot 2\pi} \approx 2 \cdot 10^{-16} \text{ s} \quad (2.3)$$

Mit der Vakuumlichtgeschwindigkeit $c = 299792458 \text{ m/s}$ bei $\lambda = 400 \text{ nm}$.

Innerhalb dieser kurzen Zeitspanne ist es nun beispielsweise möglich, dass das Molekül zwei Photonen, deren addierte Energien der Energie des angeregten Zustand entsprechen ($\hbar\omega_f = \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2$), absorbiert. Allgemein wird dann von einer Zwei-Photonen-Absorption gesprochen. Dies ist natürlich eine stark vereinfachte „anschauliche“ Vorstellung. Zur korrekten Beschreibung müssen alle Zustände berücksichtigt werden^[23].

Die Paritätsregel für Zweiphotonenprozesse besagt, dass nur Übergänge von g nach g und u nach u möglich sind. Am einfachsten ist die Vorstellung, dass zuerst eine Anregung von g nach u stattfindet und dann durch das zweite Photon die Anregung von u nach g ermöglicht wird. In der Summe würde dann eine Anregung von g nach g vorliegen. Es soll hier aber nochmals betont werden, dass der virtuelle bzw. imaginäre Zustand kein resonanter Zustand des Moleküls ist, dies dient lediglich zur Veranschaulichung, wie zum Beispiel in Abbildung 2.2. In Abbildung 2.2 kommt noch ein weiterer Prozess zum Tragen, die Fluoreszenz, auf welche an späterer Stelle noch genauer eingegangen wird. Es gibt noch viele andere Prozesse, die sich innerhalb dieser Zeitspanne abspielen können. Diese sind für die vorliegende Arbeit aber nicht von Relevanz und es wird auf weiterführende Literatur in Form eines Reviews von Peticolas verwiesen^[24].

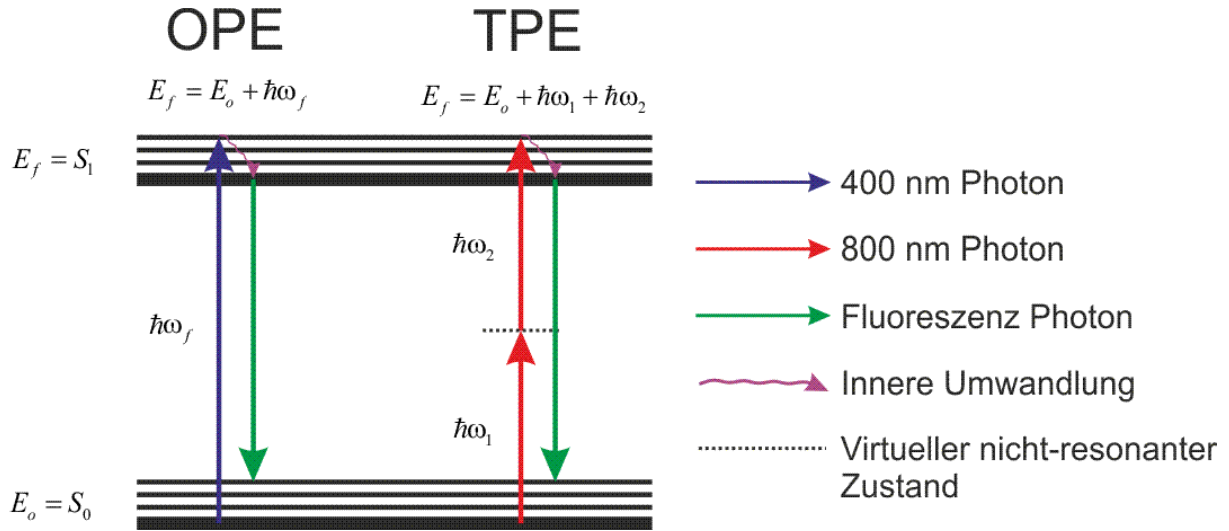


Abbildung 2.2: Einfache Veranschaulichung einer Einphotonenanregung (OPE) $E_f = E_o + \hbar\omega_f$ aus einem Grundzustand S_0 in einen angeregten, resonanten Zustand S_1 mit Hilfe eines 400 nm Photons $\hbar\omega_f$ und der entsprechenden Zweiphotonenanregung (TPE) $E_f = E_o + \hbar\omega_1 + \hbar\omega_2$ mit zwei 800 nm Photonen $\hbar\omega_1$ und $\hbar\omega_2$. In diesem Beispiel liegt der Spezialfall $\hbar\omega_1 = \hbar\omega_2$ vor, welcher sich technisch am einfachsten verwirklichen lässt. Nach der Anregung findet eine innere Umwandlung der Energie statt, bevor eine Rückkehr in den Grundzustand unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons stattfindet.

Da für einen Zweiphotonenübergang alle möglichen Kombinationsmöglichkeiten der Polarisationen der anregenden Photonen mit dem Übergangsdipolmoment des Moleküls in Frage kommen, wird der sogenannte Zweiphotonentensor \mathbf{S}^{of} eingeführt:

$$\mathbf{S}^{\text{of}} = \begin{bmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{yx} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{zx} & S_{zy} & S_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.4)$$

Die einzelnen Elemente von \mathbf{S}^{of} stellen dabei die Produkte der jeweiligen Übergangsdipolmomente $\mathbf{M}_{oi,x}\mathbf{M}_{if,x}, \mathbf{M}_{oi,x}\mathbf{M}_{if,y}, \dots, \mathbf{M}_{oi,z}\mathbf{M}_{if,z}$ dar^[3]. Die Symmetrie des Übergangs bestimmt dabei die Form des Tensors. Was für Einphotonenübergänge das Dipolmoment μ ist, ist für die Zweiphotonenübergänge der Tensor \mathbf{S} . So wie zur Charakterisierung von Einphotonenübergängen es notwendig ist das Dipolmoment μ zu kennen, so ist erst bei der Kenntnis von \mathbf{S} der Zweiphotonenübergang vollständig charakterisiert. McClain hat die Zweiphotonenübergänge theoretisch behandelt und eine sehr gute Übersicht über die verschiedenen Übergänge und die daraus abgeleiteten Tensoren erstellt^[25]. Die Ergebnisse hat er dann den jeweiligen Punktgruppen zugeordnet. Abbildung 2.3 zeigt die möglichen Tensoren für die Punktgruppe D_{2h} . Dabei ist zu beachten, dass nur Übergänge vom Grundzustand A_g betrachtet werden. Daraus folgend ist nur der Übergang

$A_g \leftarrow A_g$ totalsymmetrisch (siehe Tabelle 2.1). Wird jetzt noch die Polarisierung der Photonen berücksichtigt, so ergibt sich eine Anregung $A_g \leftarrow A_g$ nur dann, wenn beide Photonen gleich polarisiert sind (x^2 , y^2 oder z^2). Ein weiteres Beispiel wäre der Übergang $B_{3g} \leftarrow A_g$, welcher nur möglich ist, wenn ein Photon y und das andere Photon z polarisiert ist. Diese Überlegungen ergeben sich analog zur Einphotonenanregung aus der Charaktertafel für die Punktgruppe D_{2h} (Tabelle 2.2) unter Einbeziehung der quadratischen Funktionen.

$$S_A = \begin{bmatrix} S_1 & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{bmatrix} \quad S_{B_1} = \begin{bmatrix} 0 & S_4 & 0 \\ S_5 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad S_{B_2} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & S_6 \\ 0 & 0 & 0 \\ S_7 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad S_{B_3} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & S_8 \\ 0 & S_9 & 0 \end{bmatrix}$$

Abbildung 2.3: Zweiphotonentensoren für die Punktgruppe D_{2h} ^[25]. Die Übergänge finden jeweils vom Grundzustand A_g aus statt und die Symmetrie des angeregten Zustands wird durch den Index des Zweiphotonentensors beschrieben.

Einen experimentellen Zugang zum Übergangsdipolmoment sowie zum Zweiphotonentensor wird durch den Absorptionsquerschnitt ermöglicht, welcher proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmomentes bzw. Zweiphotonentensors ist.

$$\sigma \propto |\boldsymbol{\lambda} \cdot \mathbf{M}_{of}|^2 \quad (2.5)$$

$$\delta \propto |\boldsymbol{\lambda} \cdot \mathbf{S}_{of} \cdot \boldsymbol{\mu}|^2 \quad (2.6)$$

Dabei sind σ und δ die jeweiligen Absorptionsquerschnitte und $\boldsymbol{\lambda}$ sowie $\boldsymbol{\mu}$ die Polarisierungen der Photonen.

2.1.1 Zufällig orientierte Proben

Bislang bezogen sich alle Betrachtungen auf fest ausgerichtete Moleküle wie zum Beispiel in einem Kristall. Werden die Betrachtungen auf zufällig orientierte Proben, wie Gase oder Flüssigkeiten erweitert, so muss eine Mittelung über alle möglichen Orientierungen erfolgen. Im Einphotonenfall ist die Mittelung einfach:

$$\langle \sigma \rangle \propto \frac{1}{3} (\boldsymbol{\lambda} \cdot \boldsymbol{\lambda}^*) (\mathbf{M} \cdot \mathbf{M}^*) \quad (2.7)$$

Daraus ergibt sich, dass die Polarisierung im Falle einer Einphotonenanregung keinen Einfluss auf die Anregung hat, da $\lambda \cdot \lambda^* \equiv 1$ gilt^[3]. Vollkommen anders erscheint die Lage im Falle einer Zweiphotonenanregung.

$$\langle \delta \rangle = \delta_F \left(-|\lambda \cdot \mu^*|^2 + 4|\lambda \cdot \mu|^2 - 1 \right) + \delta_G \left(-|\lambda \cdot \mu^*|^2 - |\lambda \cdot \mu|^2 + 4 \right) + \delta_H \left(4|\lambda \cdot \mu^*|^2 - |\lambda \cdot \mu|^2 - 1 \right) \quad (2.8)$$

Hier kommt der Einfluss der Polarisierung deutlich zum Vorschein, da die Polarisierungen in Gleichung 2.8 nicht verschwinden. Gleichung 2.8 ist bereits vereinfacht und alle ähnlichen Elemente, welche sich aus der Mittellung ergeben, werden zu neuen Parametern δ_F , δ_G und δ_H zusammengefasst^[3].

$$\begin{aligned} \delta_F &= S_{\alpha\alpha} S_{\beta\beta}^* = \left| \sum_1^3 \text{diagonale Elemente} \right|^2 \\ \delta_G &= S_{\alpha\beta} S_{\alpha\beta}^* = \sum_1^9 |\text{jedes Element}|^2 \\ \delta_H &= S_{\alpha\beta} S_{\beta\alpha}^* = \sum_1^9 (\text{hermitesche Produkte}) \end{aligned} \quad (2.9-2.11)^{[3]}$$

mit α und $\beta = x, y, z$

Diese Parameter wurden von McClain eingeführt^[3] und geben wertvolle Hinweise auf die Symmetrie des Zweiphotonentensors. So ist δ_F die Spur des Tensors und gibt gleichzeitig Auskunft darüber, ob ein totalsymmetrischer Übergang vorliegt oder nicht. Ein totalsymmetrischer Übergang liegt dann vor, wenn δ_F größer als Null ist. Im Umkehrschluss liegt nur dann ein nichttotalsymmetrischer Übergang vor, wenn δ_F gleich Null ist. Allgemein kann δ_F nur Werte von $\delta_F \geq 0$ annehmen. Weitere Symmetrieüberlegungen lassen sich aus der Summe und der Differenz der Parameter δ_G und δ_H ableiten. So gilt aufgrund der Cauchy-Schwarz-Ungleichung: $\delta_G - \delta_H \geq 0$ und $\delta_G + \delta_H \geq 0$. Daraus ergibt sich, dass δ_G nur positive Werte oder Null und δ_H auch negative Werte annehmen kann. Ist $\delta_G - \delta_H = 0$ dann liegt ein symmetrischer Übergang vor, aus diesem Grund wird die Differenz $\delta_G - \delta_H$ als Symmetrieindikator bezeichnet^[3]. Wird $\delta_G + \delta_H = 0$, so ist der Übergang antisymmetrisch. $\delta_G + \delta_H$ wird daher auch als Antisymmetrieindikator bezeichnet. Nehmen die Summe wie auch die Differenz von δ_G und δ_H positive Werte an, so liegt keine Symmetrie vor. Als Beispiel sei hier der Übergang $A_g \leftarrow A_g$ der Punktgruppe D_{2h} angeführt (Tabelle 2.2), welcher

totalsymmetrisch ist. δ_F und $\delta_G + \delta_H$ haben für diesen Übergang jeweils einen positiven Wert während $\delta_G - \delta_H$ gleich Null ist. Eine komplette Übersicht, welche Werte für die molekularen Parameter von McClain zu erwarten sind, findet sich in der Literatur^[25].

Gleichung 2.8 kann einfach in eine lineare Funktion der Polarisationen umgewandelt werden:

$$\langle \delta \rangle = -\delta_F + 4 \cdot \delta_G - \delta_H + (-\delta_F - \delta_G + 4 \cdot \delta_H) \cdot |\lambda \cdot \mu^*|^2 + (4 \cdot \delta_F - \delta_G - \delta_H) \cdot |\lambda \cdot \mu|^2 \quad (2.12)$$

McClain stellte diesen Zusammenhang graphisch dar und nannte ihn "Die experimentelle Fläche der Zweiphotonenspektroskopie"^[3]. Abbildung 2.4 zeigt diese Fläche.

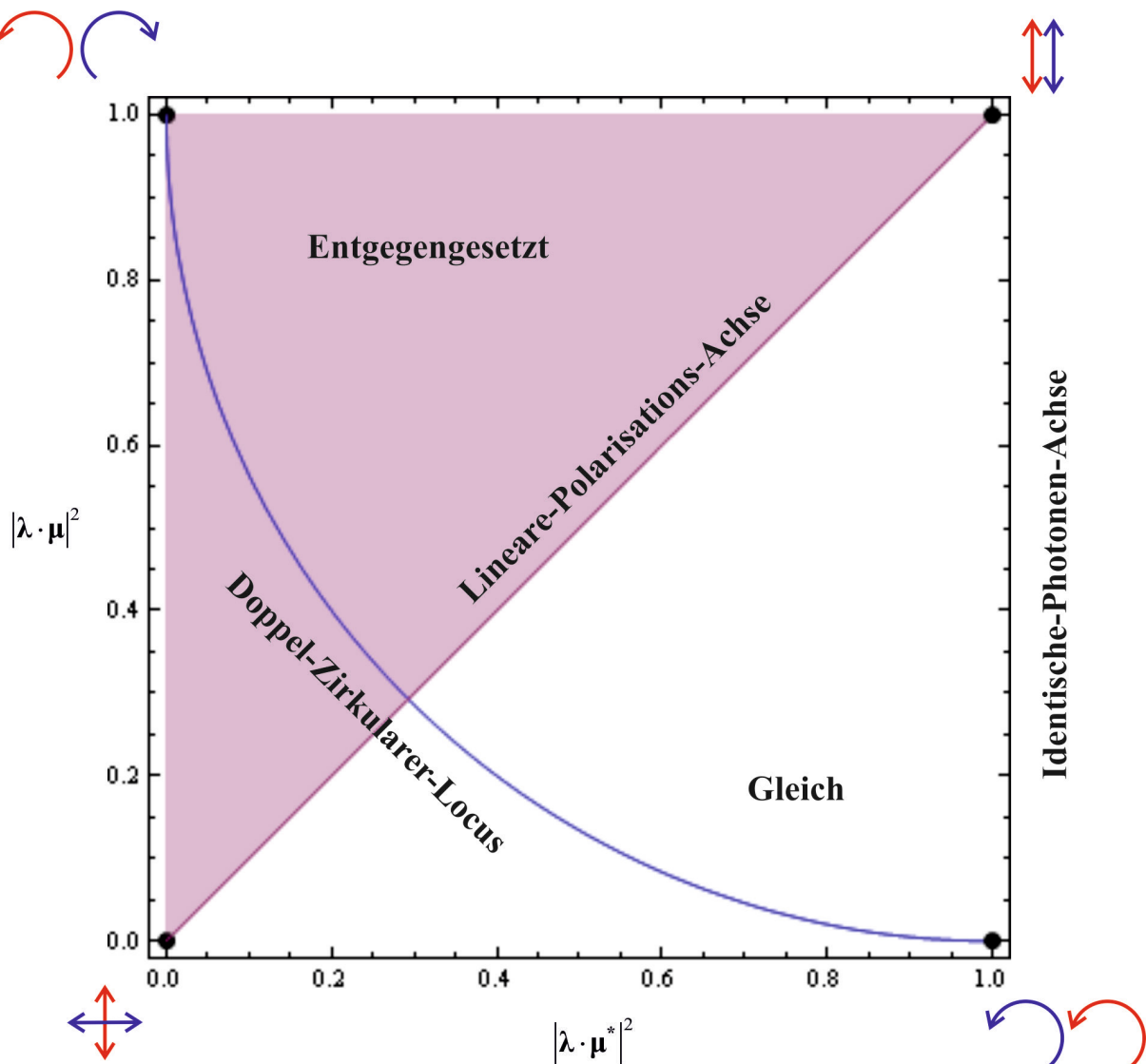


Abbildung 2.4: "Die experimentelle Fläche der Zweiphotonenspektroskopie"^[3]

Prinzipiell werden die beiden Polarisationen $|\lambda \cdot \mu^*|^2$ und $|\lambda \cdot \mu|^2$ gegeneinander aufgetragen. Daraus resultiert eine Fläche, welche sämtliche Polarisationsexperimente darstellt. Jeder

Punkt auf dieser Fläche entspricht dabei einer Anregung mit einer bestimmten Kombination von polarisierten Photonen. Die Eckpunkte stellen die Extremfälle der Polarisationen dar, welche gleichzeitig experimentell am einfachsten zu realisieren sind. So befindet sich in der unteren linken Ecke der Fall der gekreuzten linearen Polarisation, in der unteren rechten Ecke der Fall der zirkular gleich rotierenden Polarisation, in der oberen linken Ecke der Fall der zirkular entgegen rotierenden Polarisation und in der oberen rechten Ecke der Fall der linearen parallelen Polarisation. Die untere linke und die obere rechte Ecke sind durch eine Diagonale verbunden, auf der jegliche Kombinationen von linearen Polarisierungen zu finden sind. Die untere rechte und die obere linke Ecke sind durch einen Locus verbunden, auf welchem sämtliche Kombinationen von zirkularen Polarisierungen zu finden sind. Um nun ein vollständiges Polarisierungsexperiment durchzuführen, müssen drei Punkte auf dieser Fläche gemessen werden. Dabei gilt: Je weiter diese Punkte auseinander liegen, desto genauer lässt sich der Übergang bestimmen. Es ist wichtig, dass immer auch unsymmetrische Anregungen gewählt werden, da ansonsten nur symmetrische Tensoren bestimmt werden können. Außerdem ist es sonst unmöglich Übergänge mit keinerlei geometrischer Beziehung zum Zweiphotonentensor von denen mit einer geometrischen Beziehung zum Zweiphotonentensor zu unterscheiden. In dieser Arbeit werden ausschließlich Experimente durchgeführt, welche den vier Eckpunkten entsprechen. Da die vier Eckpunkte am weitesten voneinander entfernt sind, wird dadurch der maximal mögliche Kontrast erreicht.

2.1.2 Das Phänomen der Fluoreszenz

Alle bisher getätigten Überlegungen beschreiben lediglich Absorptionsexperimente. Eine Erweiterung auf Fluoreszenzexperimente ist notwendig, da für gewöhnlich die Zweiphotonenabsorption zu schwach ist, um darüber die Größen δ_F , δ_G und δ_H zu bestimmen. Fluoreszenzmessungen sind hingegen so empfindlich, dass auch einzelne Moleküle bzw. extrem schwache Übergänge (wie dies bei Zweiphotonenübergängen der Fall ist) nachgewiesen werden können. Zunächst kann die Fluoreszenz bezüglich dieser Arbeit als ein Prozess beschrieben werden, an dem drei Photonen beteiligt sind. Dabei werden zwei Photonen absorbiert und ein Photon in Form von Fluoreszenz wieder ausgesendet. Es gibt noch weitere Dreiphotonenprozesse, wie zum Beispiel die Dreiphotonenabsorption oder die Absorption von einem Photon mit anschließender Emission von zwei Photonen. Diese sind

aber von wesentlich schwächerer Intensität und daher für die vorliegende Arbeit nicht von Relevanz.

McClain beschreibt die Fluoreszenz nach folgender Gleichung^[26]:

$$I = \left\langle |\lambda_A \mu_B S_{AB}|^2 |\nu_C F_C|^2 \right\rangle \quad (2.13)$$

Dabei geht er davon aus, dass zuerst zwei Photonen kohärent absorbiert werden und anschließend ein drittes Photon emittiert wird. Beide Prozesse laufen laut Gleichung 2.13 getrennt voneinander ab. λ und μ sind die Polarisationsvektoren der Anregungsphotonen, S der Zweiphotonentensor, ν der Polarisationsvektor des Fluoreszenzphotons und F der Fluoreszenzvektor. A, B und C stehen jeweils für die Koordinaten x, y und z, so dass sämtliche Kombinationsmöglichkeiten der Koordinaten berücksichtigt werden.

Nach Mittelung und Zusammenfassen wird Gleichung 2.14 erhalten^[27]:

$$I = \sum_{j,k=1}^7 \hat{P}_j \hat{M}_{jk} \hat{Q}_k \quad (2.14)$$

Dabei sind $\hat{P}_j(\lambda, \mu, \nu)$ die Polarisationsparameter, $\hat{Q}_k(S, F)$ die molekularen Parameter und \hat{M}_{jk} die Matrix, welche zur Mittelung über alle Ausrichtungen der Momente dient. In diesem bereits vereinfachten Fall gibt es sieben molekulare Parameter, welche durch polarisationsaufgelöste Fluoreszenzmessungen bestimmt werden können. Bei Molekülen niedriger oder keiner Symmetrie können bis zu elf molekulare Parameter auftreten. Da solche Moleküle in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, wird hier auf weiterführende Literatur verwiesen^[26].

Ein großer Nachteil der von McClain eingeführten, molekularen Parametern ist die Tatsache, dass sie sich nicht klar in isotrope und anisotrope Parameter unterteilen lassen. Abhilfe wurde hier von Wan und Johnson geschaffen, welche im Gegensatz zu McClain einen anderen Ansatz gewählt haben^[5, 28]. Der Unterschied liegt in der Mittelung über alle Ausrichtungen. So beschreibt McClain den Zweiphotonentensor in kartesischen Koordinaten während Wan und Johnson den Zweiphotonentensor sowie das Fluoreszenzdipolmoment in sphärische Tensoren umwandeln. Außerdem erweiterten Wan und Johnson die Theorie um die Dimension der Zeit. So wurde die Rotation der Moleküle nach der Anregung und deren Einfluss auf die Zweiphotonenabsorption ausführlich diskutiert^[28]. Ein weiterer Punkt ist die

Verallgemeinerung des Zweiphotonenprozesses auf resonante Zwischenzustände durch Wan und Johnson. McClain's Beschreibungen der Dreiphotonenprozesse sind nur dann richtig, wenn angenommen wird, dass die intermediären Zustände bei Zweiphotonenübergängen nicht resonant sind. Letztendlich kommen beide Gruppen für nicht resonante Übergänge zu den selben Resultaten, eben nur mit dem Unterschied der Trennung in isotrope und anisotrope Parameter bei Wan und Johnson. Für resonante Zwischenzustände würden neun unterschiedliche molekulare Parameter erhalten werden. In dieser Arbeit wurden nicht resonante Zwischenzustände untersucht und alle sieben molekulare Parameter konnten bestimmt werden.

2.1.3 Die molekularen Parameter

Eine Erweiterung der Theorie wurde von Vasyutinskii und Mitarbeitern erarbeitet^[6]. Sein Formalismus ist dem von Wan und Johnson ähnlich, jedoch gibt er dem Experimentator ein einfaches Werkzeug zur Bestimmung seiner molekularen Parametern, den sogenannten M-Parametern (Gleichung 2.17, $M_{K_e}(R, R', t)$). Die Bezeichnung der M-Parameter übernimmt er von Gaisenok^[29].

$$I = -C e^{\frac{-t}{\tau}} \sum_{K_e} \sum_{K_1, K_2} \sum_{R, R'} \left(\left[\mathbf{E}_{K_1}^{(1)} \otimes \mathbf{E}_{K_2}^{(2)} \right]_{K_e} \cdot \mathbf{E}_{K_e}^{(n)} \right) \times \frac{\sqrt{(2K_1+1)(2K_2+1)(2R+1)(2R'+1)}}{2K_e+1} \begin{Bmatrix} K_1 & K_2 & K_e \\ 1 & 1 & R' \\ 1 & 1 & R \end{Bmatrix} \times M_{K_e}(R, R', t) \quad (2.15)$$

Gleichung 2.15 beschreibt allgemein die Intensität eines Übergangs durch Anregung mit zwei Photonen und anschließender Fluoreszenz nach Vasyutinskii^[7]. C ist dabei ein konstanter Vorfaktor, der von der Anregungsintensität abhängt. Der Exponentialterm $e^{\frac{-t}{\tau}}$ beschreibt das spontane Abklingen der Fluoreszenz mit der Fluoreszenzlebensdauer. Der Term $\left[\mathbf{E}_{K_1}^{(1)} \otimes \mathbf{E}_{K_2}^{(2)} \right]_{K_e} \cdot \mathbf{E}_{K_e}^{(n)}$ beschreibt Polarisationsmatrizen der beiden Anregungsphotonen sowie die Polarisationsmatrix des Fluoreszenzphotons. Der eingeklammerte Term ist ein 9-j Symbol, um die Kopplung von Drehimpulsen zu beschreiben^[30]. $M_{K_e}(R, R', t)$ sind die M-Parameter. Da K_e , sowie R und R' für eine Zweiphotonenanregung mit anschließender

Aussendung eines Fluoreszenzphotons nur die Werte 0, 1 und 2 annehmen können, ergeben sich elf molekulare Parameter. Die Anzahl der Parameter wird jedoch auf sieben gesenkt, sobald das zu untersuchende Molekül eine Symmetrie aufweist. In diesem Fall nehmen die M_1 -Parameter den Wert 0 an.

Es ergeben sich drei M_0 -Parameter, $M_0(0,0)$, $M_0(1,1)$ und $M_0(2,2)$. Diese drei sind die sogenannten isotropen Parameter und sie beschreiben die Anisotropie des Zweiphotonentensors. Desweiteren nehmen sie immer einen positiven Wert oder Null an. $M_0(0,0)$ ist proportional zu der Spur des Zweiphotonentensors, wodurch eine Aussage ob totale Symmetrie vorliegt (oder nicht) getroffen werden kann. Ist $M_0(0,0) = 0$, so liegt keine totale Symmetrie vor. $M_0(1,1)$ ist der sogenannte Nicht-Symmetrie-Parameter. Wird er Null, so liegt ein symmetrischer Zweiphotonentensor vor. Er kann jedoch auch dann den Wert Null annehmen, sollte die Anregung mit zwei Photonen identischer Wellenlänge durchgeführt worden sein. $M_0(2,2)$ hängt von allen Elementen des Zweiphotonentensors ab und hat im Gegensatz zu den beiden anderen M_0 -Parametern keine besondere Bedeutung.

Die vier M_2 -Parameter $M_2(0,2)$, $M_2(1,1)$, $M_2(1,2)$ und $M_2(2,2)$ sind die anisotropen Parameter und können positive als auch negative Werte annehmen. Sie beschreiben die Polarisation der Fluoreszenz nach der Anregung mit zwei Photonen. $M_2(0,2)$ nimmt den Wert Null an sollte ein nicht-totalsymmetrischer Übergang vorliegen. $M_2(1,1)$ und $M_2(1,2)$ nehmen den Wert Null an, wenn ein symmetrischer Zweiphotonentensor vorliegt. Sie können jedoch auch dann Null sein, sollte die Anregung mit zwei Photonen gleicher Wellenlänge erfolgt sein. $M_2(2,2)$ hängt von allen Elementen des Zweiphotonentensors ab. Aus diesem Grund besitzt dieser Parameter keine konkrete Bedeutung.

Die komplexe Gleichung 2.15 kann für den Experimentator auf eine sehr simple Form reduziert werden:

$$I(t) = \sum_{R,R',K} g_K M_K(R,R',t) \quad (2.16)$$

Mit Hilfe einer von Vasyutinskii gelieferten Tabelle (Tabelle 2.4) ist es dann möglich, die M -Parameter durch acht unabhängige Messungen zu bestimmen. Dabei sind g_K die Vorfaktoren, welche jener Tabelle entnommen werden können. In der ersten Spalte befinden sich die zu messenden Polarisationskombinationen. Dabei entsprechen X,Y und Z den Polarisierungen entlang den jeweiligen Laborkoordinatenachsen. R und L stehen für rechts- sowie linkszirkularpolarisiertes Licht. Die ersten beiden Buchstaben bestimmen die

Polarisation der Anregungsphotonen und der dritte Buchstabe steht für die Polarisation des detektierten Fluoreszenzphotons. Die erste Zeile zeigt die jeweiligen M-Parameter. Hier wurden nur die M_0 - und M_2 -Parameter aufgelistet. Die M_1 -Parameter spielen für die Messungen in dieser Arbeit keine Rolle, da sie nur für Moleküle ohne Symmetrie nicht Null sind. Desweiteren wurde die Zeitabhängigkeit der Anisotropie, sowie der M-Parameter unterdrückt, indem die Werte auf den Zeitpunkt $t=0$ extrapoliert wurden.

Der Vollständigkeit halber sei die Definition der M-Parameter nach Shternin angegeben^[6]:

$$M_{K_e}(R, R', t) = -\sqrt{3} \sum_{n_e, \tilde{n}_e} \sum_{q_e, q'_e} \left[\mathbf{F}_1^* \otimes \mathbf{F}_1 \right]_{K_e q_e} D_{q_e q'_e}^{K_e}(t) \times \left(\mathbf{S}_{R'}^* \otimes \mathbf{S}_R \right)_{K_e q'_e}^* \quad (2.17)$$

mit $D_{q_e q'_e}^{K_e}(t)$, dem Rotationsdiffusionstensor, $\mathbf{S}_{R'}$ dem Zweiphotonenanregungstensor und \mathbf{F}_{1q} dem Fluoreszenztensor.

Tabelle 2.4: Tabelle zur experimentellen Bestimmung der M-Parameter nach Vasyutinskii^[6]. Im Gegensatz zu der Originaltabelle wurden alle Werte mit einem Faktor von 9 multipliziert und in Dezimalzahlen ausgedrückt. In der linken Spalte sind die notwendigen experimentellen Intensitäten nach folgendem Code aufgeführt: die ersten beiden Buchstaben bestimmen die Polarisationen der Anregungsphotonen in den Laborkoordinaten und der dritte Buchstabe die Polarisation des Fluoreszenzphotons in Laborkoordinaten, welches detektiert wurde. R und L stehen für rechts- bzw. linkszirkularpolarisiertes Licht. Die obere Zeile gibt die entsprechenden M-Parameter an. Auf die Darstellung der zeitabhängigen M-Parameter wurde hier verzichtet, da alle Messungen zum Zeitpunkt $t=0$ extrapoliert wurden.

$I_j \backslash M_K$	$M_0(0,0)$	$M_0(1,1)$	$M_0(2,2)$	$M_2(1,1)$	$M_2(0,2)$	$M_2(1,2)$	$M_2(2,2)$
YY-Y	1	0	0.894	0	0.800	0	0.302
YY-X	1	0	0.894	0	-0.400	0	-0.151
YZ-X	0	0.866	0.671	0.346	0	0	-0.227
YZ-Y	0	0.866	0.671	-0.173	0	-0.600	0.113
RL-X	0	0	1.342	0	0	0	-0.454
RL-Y	0	0	1.342	0	0	0	0.227
RR-X	1	0.866	0.224	0.346	-0.400	0	0.076
RR-Y	1	0.866	0.224	-0.173	0.200	0	-0.038

Tabelle 2.4 wurde im Gegensatz zur Originalquelle angepasst. Es wurden alle Werte mit einem Faktor von 9 multipliziert und alle Elemente als Dezimalzahlen ausgedrückt. Dies hat

den Vorteil, dass sofort erkannt werden kann, wie sich die M-Parameter aus den einzelnen Messungen zusammensetzen.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug liefert Gaisenok. Er erstellte eine Übersicht für die Symmetrien der Übergänge durch die Absorption von zwei Photonen, ausgehend von einem totalsymmetrischen Grundzustand^[29]. Die Übersicht ist in Tabelle 2.5 wiedergegeben. In der ersten Spalte sind die Punktgruppen und in der zweiten Spalte die möglichen Symmetrien der angeregten Zustände aufgeführt. Desweiteren werden die Auswahlregeln für die M-Parameter gezeigt. Dabei bedeutet ein leeres Feld, dass der M-Parameter einen tatsächlichen messbaren Wert besitzt, welcher von Null verschieden ist und ein X, dass der M-Parameter Null ist.

Für das theoretische Beispiel, dass ein Molekül mit D_{2h} -Symmetrie im Grundzustand vorliegt und eine Anregung in den A-Zustand stattfindet, würden nur die Parameter $M_0(0,0)$, $M_0(2,2)$, $M_2(0,2)$ und $M_0(2,2)$ messbare Werte ergeben. Die Parameter $M_0(1,1)$, $M_2(1,1)$ und $M_2(1,2)$ würden in diesem Fall den Wert Null annehmen.

Tabelle 2.5: Zusammenhang der Symmetrie der Zweiphotonenabsorption mit den M-Parametern^[29]. In der ersten Spalte ist die Punktgruppe des jeweiligen Moleküls angegeben. Die zweite Spalte zeigt die Symmetrie des möglichen angeregten Zustands. Eine Anregung erfolgt immer mit zwei Photonen und aus dem totalsymmetrischen Grundzustand des Moleküls. Dazu sind die Auswahlregeln der M-Parameter angegeben. Ein leeres Feld bedeutet, dass der jeweilige M-Parameter einen Wert ungleich Null besitzt. Ein X bedeutet, dass der M-Parameter den Wert Null annimmt.

Punktgruppe des Moleküls	Symmetrie des angeregten Zustands	$M_0(0,0)$	$M_0(1,1)$	$M_0(2,2)$	$M_2(1,1)$	$M_2(0,2)$	$M_2(1,2)$	$M_2(2,2)$
C_2, C_s, C_{2h}	$A(C_2)=A'$							
	$B(C_2)=A''$	X				X		
C_{2v}, D_2, D_{2h}	$A_1(C_{2v})=A$		X		X		X	
	$A_2(C_{2v})=B_1$	X				X	X	
	$B_1(C_{2v})=B_2$	X				X	X	
	$B_2(C_{2v})=B_3$	X				X	X	
$C_3, S_6 \equiv C_{3i}$	A						X	
	E	X	X		X	X	X	
C_4, C_{4h}, S_4	A						X	
	B	X				X		X
	E	X				X		
C_{3v}, D_3, D_{3d}	A_1		X		X		X	
	A_2	X		X		X	X	
	E	X				X		
$C_{4v}, D_4, D_{2d}, D_{4h}$	A_1		X		X		X	
	A_2	X		X		X	X	X
	B_1	X	X		X	X	X	
	B_2	X	X		X	X	X	
	E	X				X		
C_{3h}, C_6, C_{6h}	A							
	E_1	X			X	X		
	E_2	X	X			X	X	
$C_{6v}, D_{3h}, D_{6h}, C_{\infty v}, D_{\infty h}$	$A_1=\Sigma^+$		X				X	
	$A_2=\Sigma^-$	X		X	X	X	X	X
	$E_1=\Pi$	X				X		
	$E_2=\Delta$	X	X		X	X	X	

2.2 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer ist die mittlere Zeit, die ein Ensemble von Molekülen im angeregten Zustand verbringt, bevor es unter Abstrahlung von Fluoreszenz wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die beste Beschreibung hierfür liefert ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung:

$$\frac{dn}{dt} = -n \cdot k_e + f(t) \quad (2.18)$$

Dabei ist n die Anzahl der Moleküle im angeregten Zustand, k_e die Rate der Emission und $f(t)$ eine zeitabhängige Funktion zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Anregung. Unter der Annahme einer sehr schnellen Anregung gegenüber der Fluoreszenzlebensdauer zum Zeitpunkt $t=0$ wird folgende Gleichung erhalten:

$$n(t) = n(0) \cdot e^{-k_e \cdot t} = n(0) \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.19)$$

Hier wird die Fluoreszenzlebensdauer als Kehrwert der Rate der Emission eingeführt und es wird deutlich, dass sich zum Zeitpunkt $t = \tau$ noch $1/e$ (rund 37 %) Moleküle im angeregten Zustand befinden. Desweiteren kann die Intensität einer Fluoreszenzabklingkurve als Summe von Exponentialfunktionen beschrieben werden:

$$I(t) = \sum_{j=1}^n \alpha_j \cdot e^{-\frac{t}{\tau_j}} \quad (2.20)$$

Wobei α_j der Beitrag der Intensität jeder einzelnen Fluoreszenzlebensdauer τ_j zur gesamten Fluoreszenzintensität $I(t)$ darstellt.

Abbildung 2.5 zeigt eine simulierte biexponentielle Fluoreszenzabklingkurve und die beiden einzelnen Abklingkurven, aus denen sich die Gesamtkurve ergibt. Die Parameter sind so gewählt, dass die blaue Kurve die fünffache Fluoreszenzlebensdauer und die Hälfte der Anfangsintensität der roten Kurve besitzt. Die schwarze Kurve ist die Summe der beiden anderen. In der logarithmischen Auftragung sind die beiden Steigungen der schwarzen Kurve deutlich erkennbar. Dies ist aber nur möglich wenn die beiden Lebensdauern sich von ihren Werten stark genug unterscheiden.

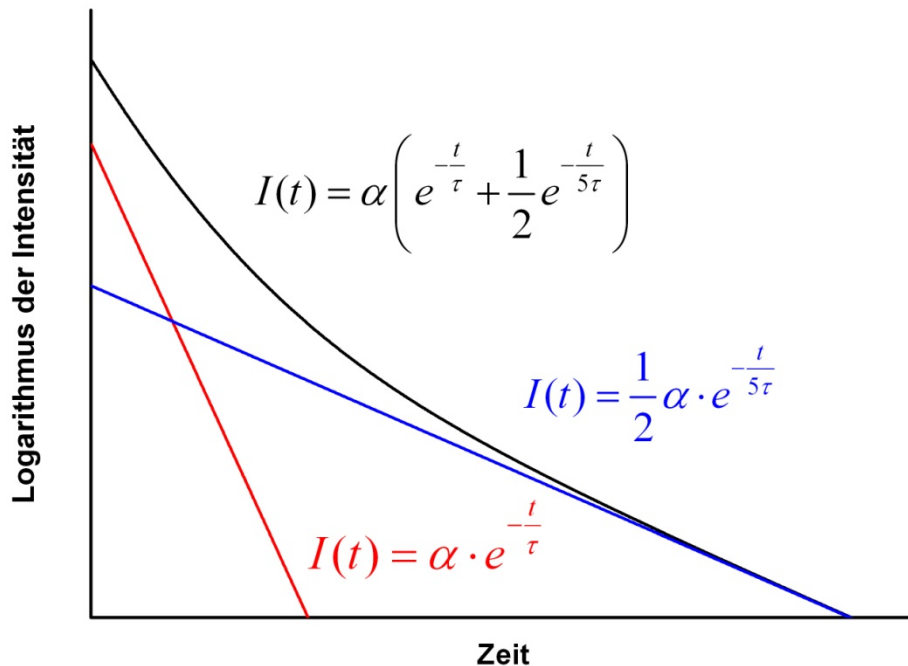


Abbildung 2.5: Simulation einer biexponentiellen Funktion und derer einzelnen Komponenten. Die blaue Kurve weist die fünffache Fluoreszenzlebensdauer und die Hälfte der Anfangsintensität der roten Kurve auf.

Zum Einen ist die Fluoreszenzlebensdauer unabhängig von der Intensität der Anregung und der Konzentration des Fluorophors. Zum Anderen ist sie abhängig von der Ionenstärke, der Viskosität, dem pH-Wert sowie der molekularen Umgebung des Moleküls. Aus diesem Grund eignet sie sich hervorragend zur Charakterisierung von Molekülen oder Prozessen, bei denen sich die zuvor genannten Bedingungen ändern^[31]. Desweiteren lässt sich die Fluoreszenzlebensdauer mit Kombination von bildgebenden Verfahren zur Visualisierung einsetzen. Es wird dann von "Fluorescence Lifetime Imaging" (FLIM) gesprochen. Im Kapitel 4.1 wird die Anwendung von FLIM zur Charakterisierung von Melanin und NADPH in *Aspergillus Ochraceus* detailliert beschrieben.

2.3 Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie

Der größte Unterschied zur „normalen“ Fluoreszenzmikroskopie ist bei der Multiphotonenmikroskopie der Einsatz von gepulsten Lasersystemen als Lichtquelle. Gepulste Lasersysteme sind notwendig um den, in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen, theoretischen Multiphotonenübergang experimentell zu realisieren. Nachfolgend wird vorwiegend auf den Fall der Zweiphotonenmikroskopie eingegangen, da in dieser Arbeit keine weiteren Multiphotonenübergänge zum Mikroskopieren benutzt wurden. Wie zuvor erwähnt, müssen zwei Photonen innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne ($\sim 10^{-16}$ s) mit dem Zielmolekül interagieren, um die Zweiphotonenanregung zu gewährleisten. Hinzu kommt das Problem des Absorptionsquerschnitts. Bei einer Einphotonenabsorption kann der Absorptionsquerschnitt über die Größe bzw. Fläche der Moleküle abgeschätzt werden. Aus diesem Grund können die Moleküle weitestgehend auf einfache geometrische Formen reduziert werden. So ist ein Vergleich mit Quadraten der Seitenlängen von 3,3 bis 0,33 Å tragbar und resultiert in Absorptionsquerschnitten von 10^{-15} bis 10^{-17} cm². Für eine Zweiphotonenanregung lässt sich der Zusammenhang nicht so einfach beschreiben. Es ist jedoch möglich den Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt folgendermaßen abzuschätzen:

$$\delta \approx \sigma_1 \cdot \sigma_2 \cdot \tau_i \approx 10^{-45} \dots 10^{-50} \frac{\text{cm}^4 \cdot \text{s}}{\text{photon}} \quad (2.21)$$

$$\text{mit } \tau_i = \frac{1}{\nu} = \frac{\lambda}{c} \approx 2,7 \cdot 10^{-15} \text{ s}$$

Mit δ = Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt; σ = Einphotonenabsorptionsquerschnitt für den Übergang vom Grund- zum intermediären Zustand und vom intermediären zum finalen Zustand; τ_i der Lebensdauer des intermediären Zustands; ν = Frequenz des Photons; c = Vakuumlichtgeschwindigkeit = 299792458 m/s; λ = 800 nm

Aus diesen Überlegungen wird sehr schnell deutlich, dass eine sehr große Anzahl an Photonen pro Zeit und Fläche, also ein hoher Photonenfluss, notwendig ist, um eine Zweiphotonenanregung zu realisieren. Am Rande sei noch erwähnt, dass zu Ehren von Frau Göppert-Mayer die Einheit GM eingeführt wurde, welche 10^{-50} cm⁴s entspricht.

Die Zweiphotonenanregung ist ein nicht-linearer Prozeß und eine Verdopplung der Anregungsintensität zieht eine Vervierfachung der Fluoreszenzintensität nach sich. Die Intensität ist dabei der Wert für die Anzahl der Photonen pro Fläche und wird oft mit dem

Photonenfluss verwechselt, welcher noch die Zeitkomponente berücksichtigt. Der Photonfluss eines Lasers mit einer kontinuierlichen Leistung von 1 mW mit einer Wellenlänge von 800 nm lässt sich wie folgt berechnen:

$$E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \approx 2.5 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

$$\frac{\text{Zahl der Photonen}}{\text{s}} = \frac{P}{E} \approx 4 \cdot 10^{15} \cdot \text{s}^{-1} \quad (2.22)$$

Mit h = Plancksches Wirkungsquantum = $6.62606957 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$; ν = Frequenz des Photons; c = Vakuumlichtgeschwindigkeit = 299792458 m/s ; λ = 800 nm; P = Leistung, E = Energie des Photons.

Allein dieser Photonfluss kann nicht ausreichen, um einen Zweiphotonenprozess zu ermöglichen, zumindest wenn die vorangegangenen Überlegungen zur Zweiphotonenabsorption berücksichtigt werden. Eine Erhöhung der Photonenzahl pro Fläche kann zum Beispiel durch die Fokussierung mit einem Objektiv erreicht werden. Die Anzahl der Photonen wird dann durch die Fläche der Fokusebene geteilt und es ergibt sich:

$$\frac{\text{Zahl der Photonen}}{D} \approx 3,1 \cdot 10^{23} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}} \quad (2.23)$$

$$\text{mit } D = \left(\frac{0,61 \cdot \lambda}{\text{NA}} \right)^2 \cdot \frac{\pi}{4}$$

Mit: D = Fläche der Fokusebene; NA = numerische Apertur, in diesem Fall 1,2; λ = 800 nm.

Die Fokusebene wurde in diesem Beispiel als einfache Kreisfläche angenommen. Dies ist eine starke Vereinfachung der Natur und ein gaussförmiges Strahlprofil wäre eine bessere Näherung, jedoch reicht für die folgenden Betrachtungen die Annahme der Kreisfläche vollkommen aus. Wie zuvor erwähnt, wird bei einem Zweiphotonenprozess die Intensität quadriert, was einen Wert von $\approx 9,6 \cdot 10^{46} \text{ Photonen}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-2}$ ergibt. Dadurch wäre eine Anregungswahrscheinlichkeit von ca. 20 % gegeben, wenn von einer Rhodamin B-Lösung mit einem Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt von $210 \text{ GM}^{[32]}$ ausgegangen wird. Für eine bildgebende Technik reichen diese Werte jedoch nicht aus. So würde eine $100 \mu\text{M}$ Rhodamin B-Lösung bei einer Anregung mit einer mittleren Leistung von 1 mW und einer Wellenlänge von 800 nm grob 18000 Moleküle pro Sekunde anregen. Abschätzen lässt sich dieser Wert durch folgende Näherung:

$$N_F = \delta \cdot I_0^2 \cdot N_{mol} \cdot V_A \quad (2.24)$$

Dabei sind δ = Zweiphotonenabsorptionsquerschnitt = $210 \text{ GM}^{[32]}$; I_0 die Ausgangsleistung pro Fläche = $3 \cdot 10^{23} \text{ Photonen} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; N_{mol} = die Anzahl der Moleküle $\approx 6 \cdot 10^{15} \text{ Moleküle} \cdot \text{cm}^{-3}$; V_A = das Anregungsvolumen $\approx 1,5 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^3$.

Generell wird von einem Detektionsverlust von einem Faktor von 10^3 ausgegangen. Ein weiteres Problem ist die Verteilung der Fluoreszenzphotonen im Raum. So werden die Photonen gleichverteilt in alle drei Raumrichtungen ausgesendet und nur ein Teil durch das Mikroskopobjektiv gebündelt. Aus diesen Gründen ist es nötig gepulste Lasersysteme für die Multiphotonenmikroskopie zu verwenden, da diese die Anzahl der emittierten Fluoreszenzphotonen um einige Größenordnungen erhöhen. Der Grund dafür liegt in der Komprimierung der Anregungsenergie in sehr schmale Pulse, welche dann mit einer hohen Wiederholrate ausgesendet werden. Diese Werte werden durch die gemittelte quadrierte Intensität berücksichtigt. Sie ergibt sich aus der Anzahl an Pulsen pro Sekunde, multipliziert mit der integrierten Intensität eines einzelnen Pulses. Die Intensität des einzelnen Pulses berechnet sich analog zu Gleichung 2.23 mit dem Unterschied, dass die Pulsbreite und Wiederholrate des verwendeten Lasersystems mit einfließen:

$$\frac{\text{Zahl der Photonen}}{D \cdot R \cdot \tau_p} \approx 4,1 \cdot 10^{28} \frac{\text{Photonen}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}} \quad (2.25)$$

Mit R = Wiederholrate = $76 \text{ MHz} = 76 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$; τ_p = Pulsbreite = 100 fs .

Das in dieser Arbeit verwendete Lasersystem besitzt die gleichen Spezifikationen wie sie in Gleichung 2.25 verwendet wurden. Wird die Intensität jetzt quadriert und wird noch ein Faktor für die Pulsform eingeführt, lässt sich die gemittelte quadrierte Intensität $\langle I(t)^2 \rangle$ wie folgt berechnen^[8]:

$$\langle I(t)^2 \rangle = \frac{g_p \langle I(t) \rangle^2}{R \cdot \tau_p} \quad (2.26)$$

Mit $g_p = 0.66$ für einen gaussförmigen Puls.

Durch den Faktor $\frac{g_p}{R \cdot \tau_p} \approx 10^5$ wird die Anzahl der ausgesendeten Fluoreszenzphotonen um fünf Größenordnungen erhöht, wodurch die Zweiphotonenmikroskopie in vielen Anwendungen eingesetzt werden kann.

Ein wichtiger Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie gegenüber der gängigen Fluoreszenzmikroskopie ist die intrinsische dreidimensionale Auflösung, welche sich durch den Anregungsprozess ergibt. Die Wahrscheinlichkeit für einen Zweiphotonenübergang ist nur in der fokalen Ebene groß genug, um genügend Fluoreszenzphotonen für eine bildgebende Technik zu generieren. Da das Anregungsvolumen weniger als ein Femtoliter ist, ergibt sich dadurch automatisch nur ein sehr kleiner Fluoreszenzspot, welcher direkt detektiert werden kann. Durch Rastern der Probe, was entweder durch die Veränderung der Position der Probe oder durch die Veränderung der Position des Laserfokus durchgeführt werden kann, kann somit eine Fluoreszenzkarte erstellt werden, deren Auflösung nur durch das Anregungsvolumen begrenzt ist. Bei der gängigen Fluoreszenzmikroskopie ist der Einsatz von Aperturen direkt vor den Detektoren notwendig, um die unerwünschte Fluoreszenz jenseits der Fokalebene des Mikroskopobjektivs zu blockieren. Der Unterschied zwischen einer Ein- und Zweiphotonenanregung einer Rhodamin B-Lösung ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

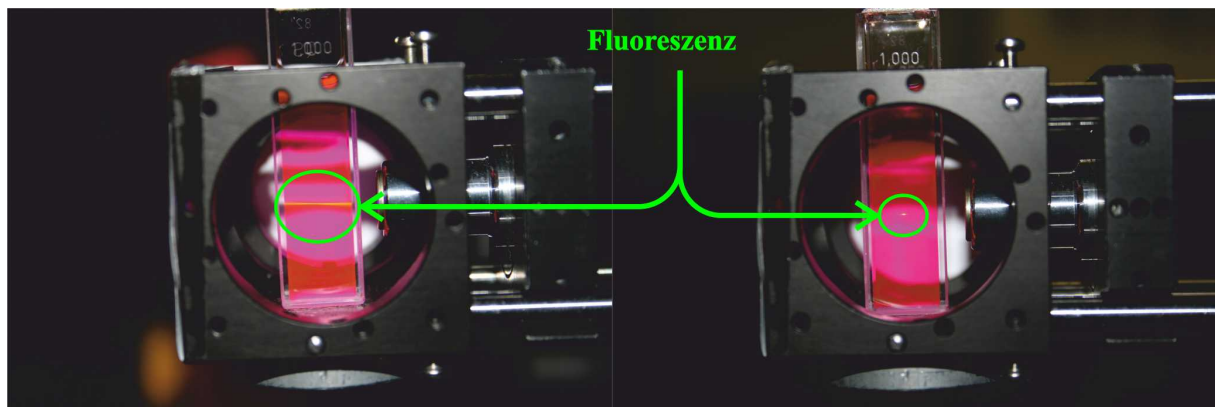


Abbildung 2.6: Unterschied zwischen Ein- und Zweiphotonenanregung am Beispiel Rhodamin B. Links ist die Einphotonenanregung und rechts die Zweiphotonenanregung dargestellt. Während auf der linken Seite die Anregung über den gesamten Küvettendurchmesser stattfindet, leuchtet auf der rechten Seite nur ein winziger Punkt.

Die Zweiphotonenmikroskopie ermöglicht, im Gegensatz zur gängigen Fluoreszenzmikroskopie, das leichtere Abtrennen des Anregungslichtes von der Fluoreszenz, da der Unterschied der Wellenlängen in der Regel sehr groß ist und optische Filter das Licht der Anregung nahezu vollständig blockieren können. Ein weiterer Vorteil der Zweiphotonenmikroskopie ist die hohe Eindringtiefe der langwelligen Strahlung bei gleichzeitig geringerer

Belastung der Probe. Da meist Wellenlängen nahe dem Infrarotbereich des Lichtspektrums, wie zum Beispiel 800 nm, verwendet werden, kann diese Strahlung beispielsweise biologische Proben einfacher passieren als die vergleichbare UV-nahe Strahlung (400 nm), welche bei der Einphotonenmikroskopie verwendet wird. Dadurch werden die Eindringtiefe und die Tiefenauflösung entscheidend verbessert, während die Probe geringerer Belastung durch die Strahlung an sich ausgeliefert ist. Auch das Ausbleichen der Proben wird reduziert, da die Anregung stark lokalisiert in der fokalen Ebene des Objektivs auftritt.

3. Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt. Zunächst werden kurz die Materialien aufgelistet. Anschließend werden die verschiedenen Experimente vorgestellt. Abschließend wird die Analyse der erhaltenen Daten beschrieben.

3.1 Materialien

Lösungsmittel

Als Lösungsmittel wurden 1,2-Propandiol, n-Hexan sowie Mischungen aus Cyclohexan und Mineralöl (Paraffinöl) verwendet. 1,2-Propandiol, Cyclohexan und n-Hexan wurden bei Sigma Aldrich und das Mineralöl bei Acros Organics erstanden. Alle Lösungsmittel besitzen spektroskopischen Reinheitsgrad und wurden ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Proben für die Polarisationsexperimente

Als Proben für die Polarisationsexperimente dienten 2-Methyl-5-*t*-butyl-*p*-quaterphenyl (DMQ), Indol, L-Tryptophan, D-Tryptophan, *N*-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA) und *N* α -(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-tryptophan (Boc-Trp-OH). DMQ wurde in 1 mmol 50/50 Mischungen aus Cyclohexan und dem Paraffinöl sowie in 1 mmol n-Hexanlösungen untersucht. Die restlichen Polarisationsexperimente fanden in 25 mmol 1,2-Propandiollösungen statt.

Biologische Proben

Die biologischen Proben wurden von der Arbeitsgruppe um Professor Krull des Institutes für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Braunschweig bereit gestellt und wie folgt präpariert:

Zur Herstellung messbarer Sporenproben wurden die entsprechenden Agarplatten mit *Aspergillus Ochraceus* (Strang DSM 63304) geimpft und acht Tage bei 24 °C im Dunkeln kultiviert. Anschließend wurden die Sporen durch Zugabe von 25 mL steriler Kochsalzlösung und schütteln mit Glaskügelchen geerntet. Dadurch wurde eine Sporensuspension erhalten, welche durch einen "Miracloth"-Filter (25 μ m) gefiltert wurde. Es wurden Kulturen auf Malzextrakt, Haferkleie und Weizenkleie aufgezogen.

Es wurden fünf verschiedene Probentypen bereit gestellt: frisch geerntete, sieben Tage gelagerte, abgetötete, frisch geerntet gekeimte und sieben Tage gelagert gekeimte Sporen. Die Lagerung erfolgte sieben Tage lang bei 4 °C in Form einer Suspension mit Wasser. Zur Herstellung abgetöteter Sporen wurden frisch geerntete Sporen für 30 Minuten bei 100 °C sterilisiert. Anschließend Tests zeigten, dass kein Wachstum und keine Keimung mehr möglich waren. Zur Herstellung gekeimter Sporen wurden entweder frisch geerntete oder gelagerte Sporen für 6 Stunden in flüssiges Malzextraktmedium eingetaucht.

Objektträger und Abdeckgläschen

Zur Fixierung der Sporenproben war eine spezielle chemische Behandlung der verwendeten Objektträger und Abdeckgläschen nötig. Dazu wurde die Oberfläche der handelsüblichen Objektträger und Abdeckgläschen silanisiert, indem sie mit einer Chloroform-Lösung benetzt wurde, welche 5 % Dimethylchlorosilan enthielt. Anschließend wurde über Nacht getrocknet und dann für zwei Stunden auf 180 °C erhitzt. Durch die Erhöhung der Hydrophobizität der Oberfläche konnten sich die Sporen leichter an diese anlagern und ein Verrutschen durch das Scannen der Probe während der Messung konnte so verhindert werden.

3.2 Experimenteller Aufbau

Für die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Aufbauten benutzt. Die Aufbauten unterscheiden sich grundsätzlich nur in der Art und Weise wie die Rohdaten aufgenommen werden. Während für die biologischen Messungen die Mikroskopie und die Aufnahme von Fluoreszenzbildern im Vordergrund stand, wurde bei den Polarisationsmessungen reine Spektroskopie betrieben. Im Folgenden werden die jeweiligen Aufbauten detailliert beschrieben.

3.2.1 Mikroskopaufbau für die Sporenmessungen

Der Aufbau für die Messungen an den Pilzsporen ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Es wurde ein Titan-Saphir-Laser (Ti:Sa, Mira 900D, Coherent, Santa Clara, Kalifornien) mit einem 532 nm Neodym-Yttriumvanadat-Laser (YAG, Verdi 10 W, Coherent, Santa Clara, Kalifornien) gepumpt. Die Emissionswellenlängen des Ti:Sa können in einem Bereich von 700 bis 980 nm frei eingestellt werden. Anschließend wird der Laserstrahl durch einen Cavity Dumper (APE-Angewandte Physik und Elektronik, Berlin) mit einer Frequenzverdopplungseinheit (SHG) geführt. Für die biologischen Messungen wurde der Cavity Dumper samt SHG nicht genutzt, da nur die Fundamentale des Ti:Sa für die Zweiphotonenmikroskopie benötigt wird. Durch ein achromatisches Verzögerungsplättchen (Lambda-Halbe, B. Halle Nachfl. GmbH, Berlin) und einen Polarisator (Lambda-Halbe, B. Halle Nachfl. GmbH, Berlin) konnte die Leistung des Laserstrahls frei variiert werden. Der Laserstrahl wurde durch ein Wasserobjektiv (C-Apochromat, 40x, NA1.2, ZEISS, Jena) auf die Probe fokussiert. Die Probe konnte durch einen Piezo gesteuerten Tisch (Modell 4733, Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe) gescannt werden. Die Fluoreszenz wurde dann von dem Wasserobjektiv gesammelt und durch einen Kurzpass- BG 39-Filter (Schott, Mainz) sowie einen Kurzpassemissionsfilter (FF01-460/80, Semrock) gefiltert, um die Reste des Anregungslichtes zu entfernen. Letztendlich wurde die Fluoreszenz auf einen Detektor (APD, PDM series, MPD, Bolzano, Italy) fokussiert, welcher mit einem Time-Related-Single-Photon-Counting (TCSPC) Gerät verbunden war (PicoHarp 300, Pico Quant GmbH, Berlin). Das Signal wurde mit Hilfe der Software SymPhoTime (V5.2.3.2, Pico Quant GmbH, Berlin) aufgenommen und anschließend als binäre Daten exportiert. Die Auswertung erfolgte mit einem selbstgeschriebenen Programm in

der Programmiersprache MatLab (MatLab 2010). Auf die konkrete Auswertung der Rohdaten wird im Methodenteil dieser Arbeit eingegangen.

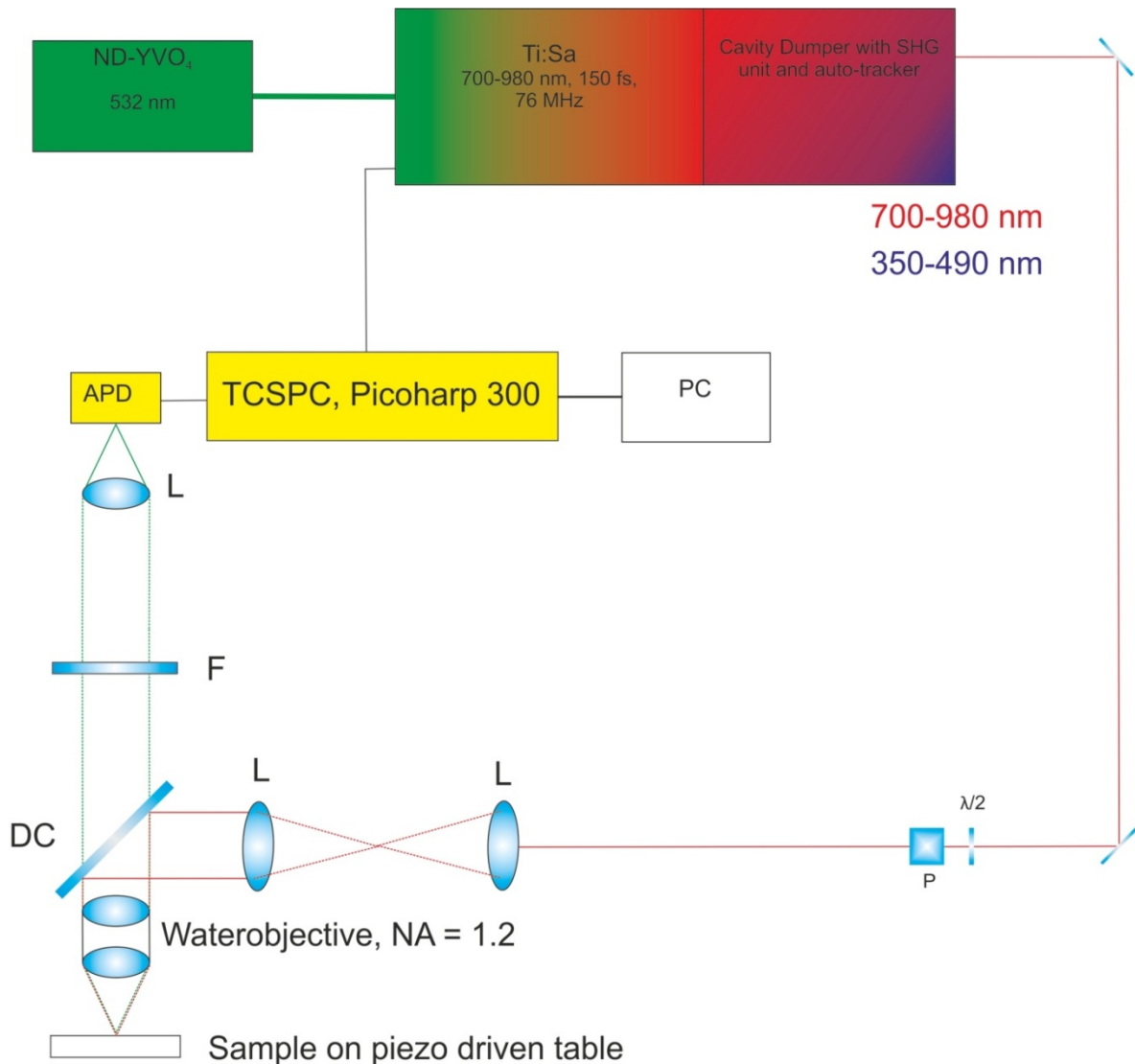


Abbildung 3.1: Experimenteller Aufbau für die biologischen Messungen an Pilzsporen. $\lambda/2$: Lambda-Halbe-Verzögerungsplättchen; P: Polarisator; L: Linse; DC: Dichroitischer Spiegel; F: Emissionsfilter; APD: Avalanche Photo Diode; TCSPC: Time-Correlated-Single-Photon-Counting Gerät.

3.2.2 Aufbau für die Polarisationsmessungen

Der allgemeine Aufbau musste für die Polarisationsmessungen modifiziert werden. Es wäre zwar prinzipiell möglich einen Mikroskopaufbau zu verwenden, jedoch würde das einige Nachteile mit sich bringen. Das größte Problem ist die Verwendung von Objektiven mit einer großen numerischen Apertur. Eine große numerische Apertur sorgt für eine Depolarisation der Anregung wie auch der Emission. Dieses Phänomen wurde im Detail von Shribak et al untersucht^[33]. Ein weiteres Problem stellt das Experiment an sich dar. Für ein komplettes Polarisationsexperiment ist es notwendig gleichzeitig mit zwei Strahlen verschiedener Wellenlängen zu arbeiten, um deren Polarisation unabhängig voneinander einstellen zu können. Eine Lösung für dieses Problem könnte die Verwendung von dichroitischen Spiegeln sein, jedoch findet an ihnen wieder eine Depolarisation statt. Außerdem müssten achromatische Optiken verwendet werden, da sonst die Strahlen nicht räumlich kohärent wären.

Der verwendete Aufbau für die Polarisationsmessungen ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Wie zuvor erwähnt, werden zwei Laserstrahlen benötigt. Realisiert wird dies durch die Frequenzverdopplung der Fundamentalen des Ti:Sa-Lasers mit Hilfe eines β -Bariumborat-Kristalls (BBO). Anschließend werden beide Strahlen innerhalb des Cavity Dumpers durch einen dichroitischen Spiegel getrennt und ihre Polarisationen können dann unabhängig voneinander durch $\lambda/2$ - bzw. $\lambda/4$ -Verzögerungsplättchen (Lambda-Halbe, B. Halle Nachfl. GmbH, Berlin) eingestellt werden. Die linearen Polarisationen konnten mit $> 99\%$ und die zirkularen mit $> 97\%$ Genauigkeit eingestellt werden. Das verwendete Polarisationschema wird zu einem späteren Zeitpunkt detailliert beschrieben.

An dieser Stelle soll eine kurze Anmerkung zum Cavity Dumper erfolgen. Der Cavity Dumper enthält den BBO Kristall sowie einen Autokorrektor zur Korrektur des Strahlversatzes für verschiedene Wellenlängen. Generell wird ein Cavity Dumper dazu benutzt, die Wiederholrate eines gepulsten Lasersystems zu variieren. Dies kann zum Beispiel für Messungen an Fluorophoren mit sehr langen Fluoreszenzlebensdauern ($> 10\text{ ns}$) hilfreich beziehungsweise notwendig sein. In dieser Arbeit wurde nur die SHG-Einheit des Cavity Dumpers zur Frequenzverdoppelung benutzt. Es fand keine Modulation der Wiederholrate des Ti:Sa-Lasers statt. Um eine Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung zu generieren, ist es nötig, beide Strahlen innerhalb der Probe zeitlich und räumlich zur Kohärenz zu bringen.

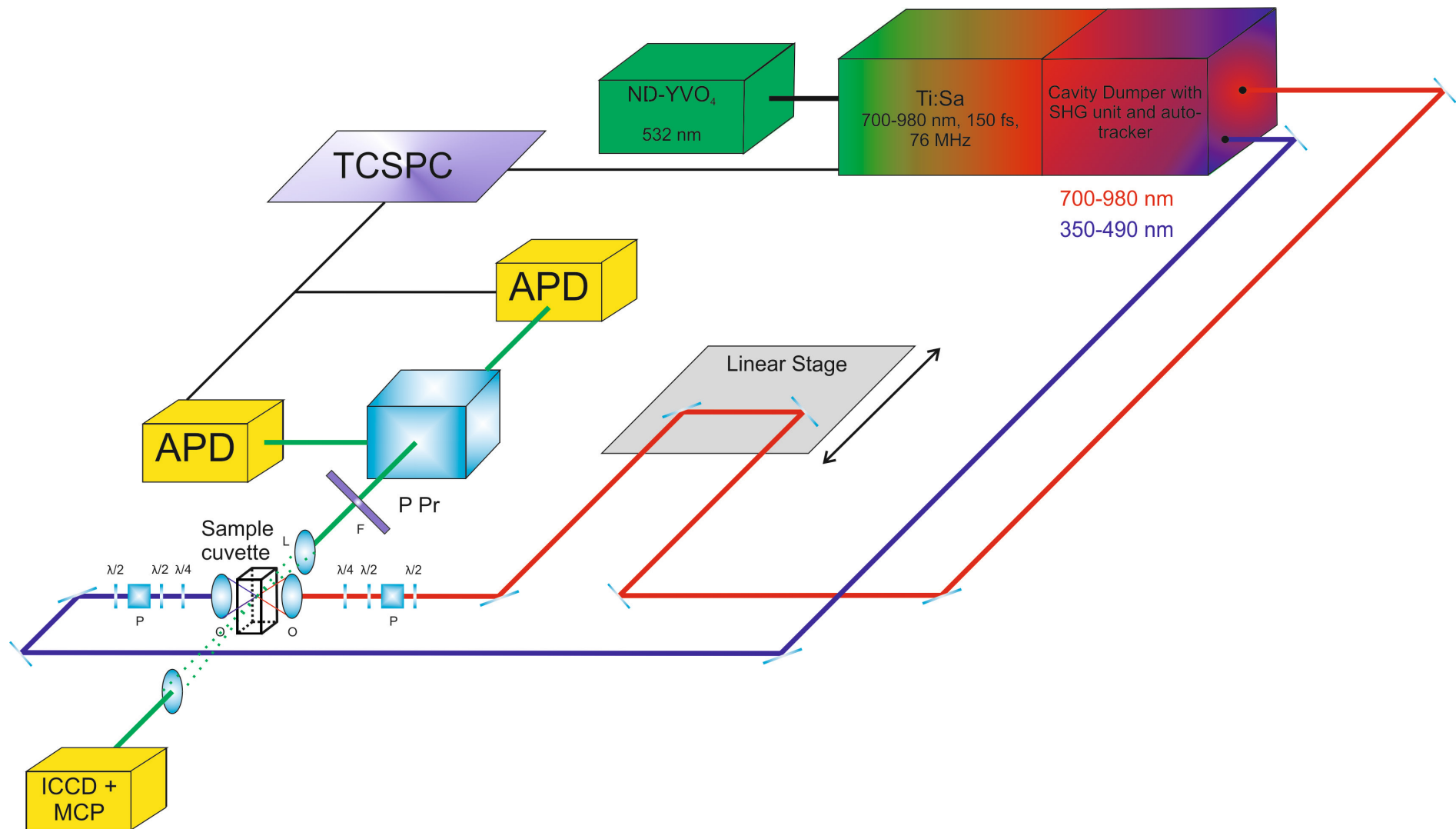


Abbildung 3.2: Experimenteller Aufbau für die Polarisationsmessungen. $\lambda/2$: Lambda-Halbe-Verzögerungsplättchen; $\lambda/4$: Lambda-Viertel-Verzögerungsplättchen; P: Polarisator; L: Linse; O: Objektiv; F: Emissionsfilter; PPr: Polarisationsprisma; APD: Avalanche Photo Diode; TCSPC: Time-Correlated-Single-Photon-Counting Gerät; ICCD + MCP: Intensified charge-coupled device Kamera mit Multi-Channel-Plate Verstärkung.

Die räumliche Überlappung erfolgt durch Ausrichtung der Foki in der Probe, indem die Strahlen durch ein justierbares Linsensystem direkt vor den Objektiven laufen. Dabei wird der rote Fokus nur in X- und Y-Richtung verstellt, während der blaue Fokus in Z-Richtung manipuliert wird. Die Z-Richtung ist dabei die Ausbreitungsrichtung der Strahlen. Es ist sehr wichtig, dass die Strahlen bereits ohne Einbau der Optiken sehr gut überlappen, anderenfalls ist es unmöglich die räumliche Kohärenz zu erreichen. Die räumliche Überlappung wird mit Hilfe der ICCD-Kamera (PicoStar HR, LaVision Biotech) überprüft und genau eingestellt. Sie ermöglicht die Visualisierung der Foki, welche in der Größenordnung von einigen wenigen Mikrometern liegen in Echtzeit und somit die perfekte Justage. Um die zeitliche Überlappung der Strahlen zu realisieren, wird eine Linear Stage verwendet. Prinzipiell handelt es sich dabei um eine bewegliche Platte, auf der zwei Spiegel montiert sind. Dadurch kann die Strecke, welche der rote Strahl zurück legt, im Bereich von Mikrometern variiert werden. Da sich beide Strahlen gleich schnell ausbreiten, kann so der zeitliche Überlapp gewährleistet werden. Generell ist es sinnvoll, erst den räumlichen und dann den zeitlichen Überlapp zu justieren. Zur Justage eignen sich Lösungen von UV-Farbstoffen mit sehr guten Quantenausbeuten, wie zum Beispiel DMQ. Gute Quantenausbeuten sind wichtig, da der Fluoreszenzspot, der durch den roten Strahl erhalten wird, aus einer Dreiphotonenanregung resultiert. Der blaue Strahl führt zu einer Zweiphotonenanregung bei den jeweiligen Molekülproben. Dabei werden höhere Schwingungs- und Rotationszustände angeregt, welche nach innerer Umwandlung Energie verlieren und schließlich unter Emission von Fluoreszenzphotonen in den Grundzustand zurückfallen. Alle beschriebenen Prozesse sind noch einmal schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt.

Werden beide Strahlen zur Überlappung gebracht, kommt es für die ausgewählten Moleküle zu einer exponentiellen Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Dies kann natürlich nur dann stattfinden, wenn die Absorption der jeweiligen Probe nur im Bereich der Wellenlänge der Zweifarben-Zweiphotonenanregung große Werte besitzt. Für die Fluoreszenzbandbreite des Ti:Sa-Lasers von 700 bis 980 nm und dem in dieser Arbeit benutzen Aufbau kommen daher bevorzugt Moleküle mit Absorptionsbanden im UV-Bereich in Frage. Zum Beispiel würde eine Anregung mit einem 800 nm Photon und dessem frequenzverdoppelten Analogon (400 nm) zu einer 2C2P-Anregung bei 266 nm führen. Es ist grundsätzlich nötig, die Hintergrundsignale der Zwei- und Dreiphotonenanregung so gering wie möglich einzustellen, da anderenfalls die Polarisationsmessungen verfälscht werden könnten.

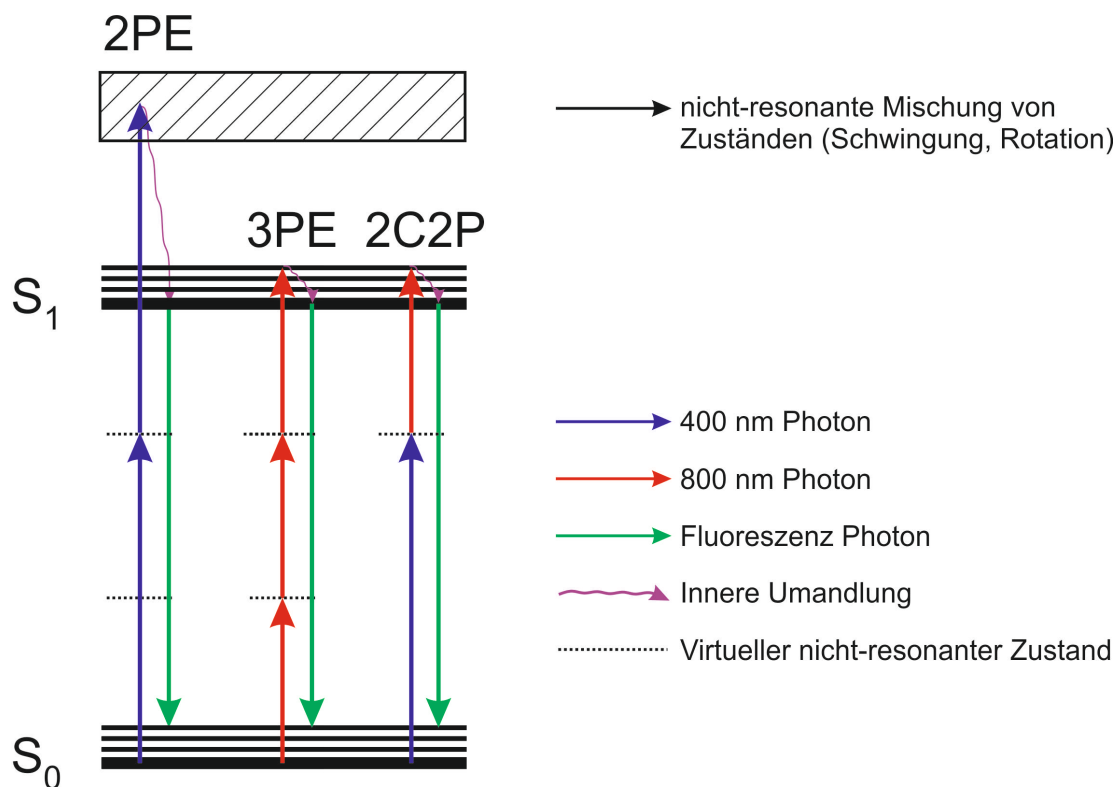


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung (2C2P) sowie derer Konkurrenzprozesse in Form von Zweiphotonenanregung (2PE) und Dreiphotonenanregung (3PE) bei einer Ausgangswellenlänge des Lasers von 800 nm.

Abbildung 3.4 zeigt das Resultat der Justage mit DMQ gelöst in einer 50/50 Cyclohexan/Paraffin-Mischung. Die Hintergrundsignale der Zwei- und Dreiphotonenanregung besitzen jeweils unter 3 % Anteil am Gesamtsignal. Im unteren Bereich von Abbildung 3.4 sind die Bilder der ICCD Kamera dargestellt, um eine bessere Vorstellung von der Visualisierung zu geben.

Die Fluoreszenz wird von einer Linse gesammelt und anschließend durch ein Polarisationsprisma (Glan-Laser alpha-BBO Polarizer, München) in ihre vertikalen und horizontalen Polarisationsanteile aufgespalten. Die jeweiligen Signale wurden auf zwei APDs fokussiert und simultan detektiert.

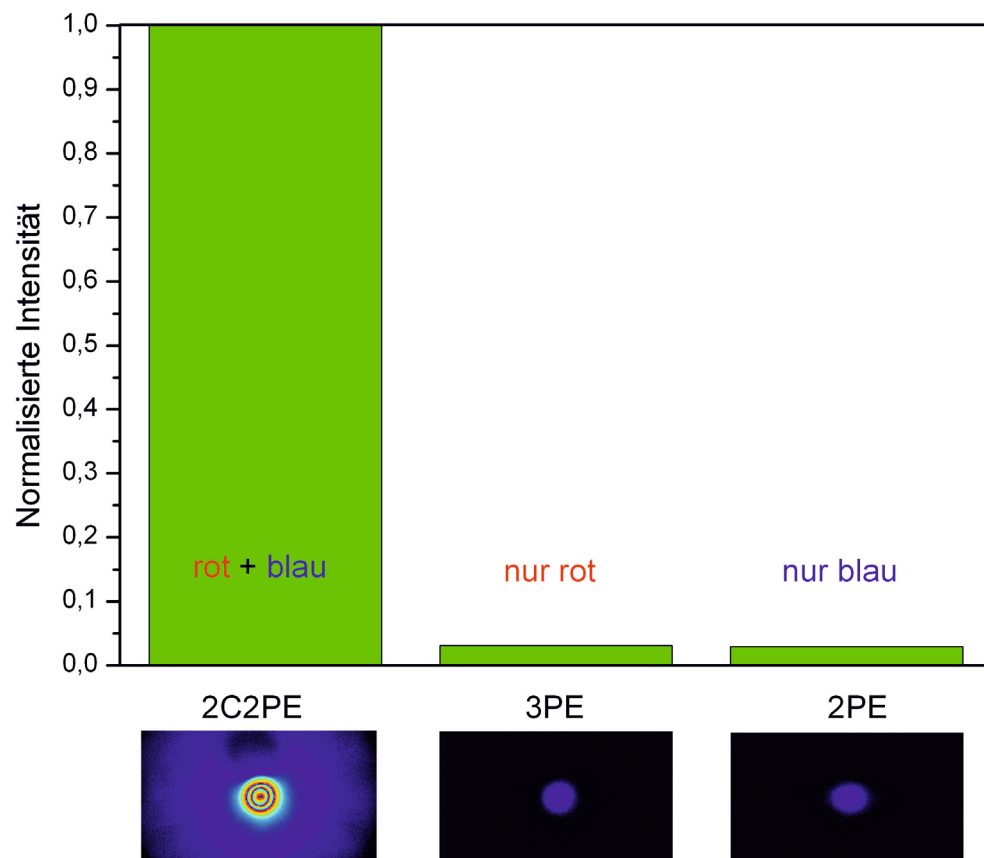


Abbildung 3.4: 2C2P-Justage mit einer 1 mmol DMQ-Cyclohexan/Paraffin-Lösung; Die Anteile der Zwei- bzw. Dreiphotonenanregung betragen jeweils < 3 % bezogen auf das Gesamtsignal. Im unteren Teil ist die Ausgabe der ICCD-Kamera während der Justage dargestellt.

3.2.3 Polarisationschema

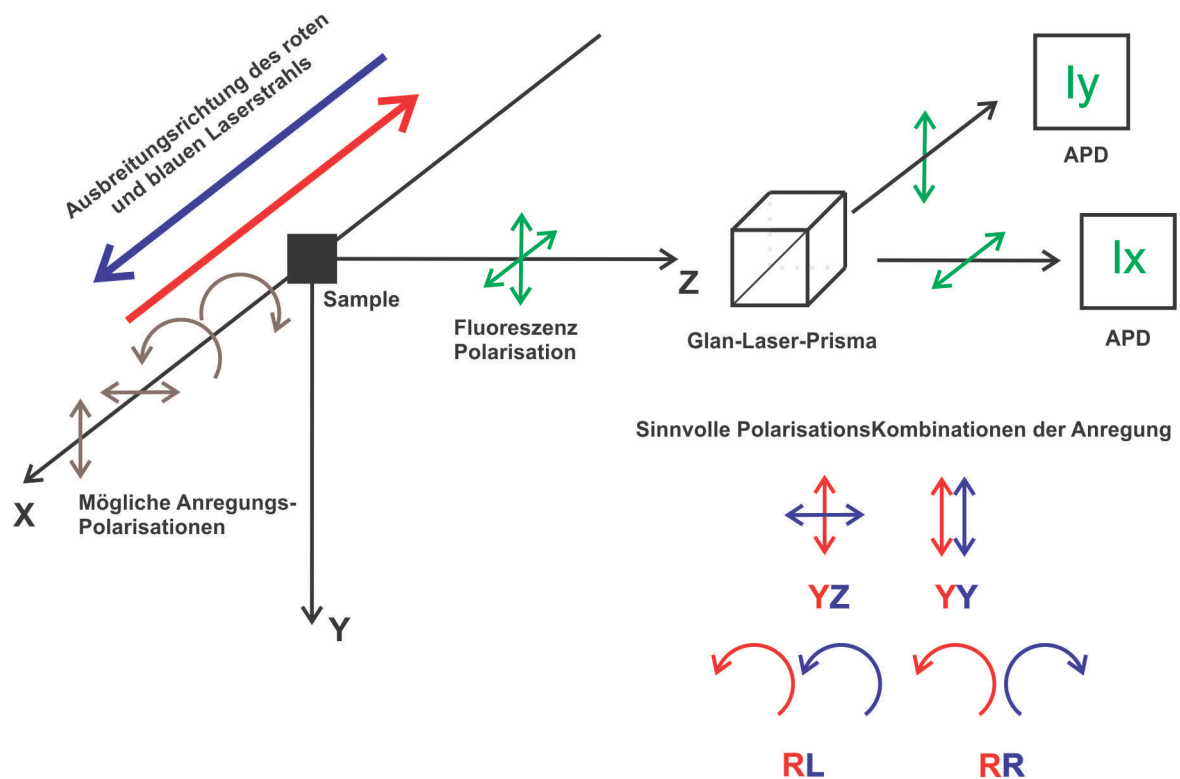


Abbildung 3.5: Polarisationschema der Polarisationmessungen. Die Anregung erfolgt entlang der X-Achse, jedoch für beide Strahlen entgegengesetzt. Die Detektion findet entlang der Z-Achse statt, wobei in X- und Y-Polarisation unterschieden wird. Im unteren rechten Teil die sinnvollen Polarisationskombinationen für die Anregung gezeigt. Die Farben entsprechen den verwendeten Wellenlängen (rot 800 nm, blau 400 nm).

Abbildung 3.5 zeigt das Schema, welches für die Polarisationmessungen benutzt wurde. Die Anregung erfolgte entlang der X-Achse, wobei sich der rote und der blaue Laserstrahl entgegengesetzt ausbreiten. Dabei können die einzelnen Strahlen durch Einsatz der Lambda-Halbe-Verzögerungsplättchen jeweils in Y- oder Z-Richtung linear polarisiert werden. Außerdem ist es möglich mit Hilfe der Lambda-Viertel-Verzögerungsplättchen rechts-, bzw. linkszirkular polarisiertes Licht zu erzeugen. Die Fluoreszenz wird dann entlang der Z-Achse durch ein Polarisationsprisma geführt und in ihre X- bzw. Y-Komponente zerlegt. Die sinnvollen Polarisationskombinationen sind linear parallel, linear gekreuzt, zirkular gleichsinnig und zirkular gegensinnig. Dadurch ist es möglich ein komplettes Polarisationsexperiment durchzuführen und entsprechend der Theorie im Kapitel 2 auszuwerten.

3.3 Analyse von Fluoreszenzdaten

Nachfolgend wird die Analyse der gemessenen Daten beschrieben. Zunächst wird die allgemeine Faltung der Signale mit der Apparatefunktion beschrieben und wie sie in den Fits berücksichtigt wird. Anschließend wird die Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer beschrieben und wie mit ihrer Hilfe ein Fluoreszenzlebensdauerbild generiert werden kann. Abschließend wird die Bestimmung der molekularen Parameter präsentiert.

3.3.1 Faltung der Signale

Generell entsprechen die beobachteten Fluoreszenzsignale $I(t)$ nicht der wahren Fluoreszenz. Dies resultiert aus der Faltung der wahren Fluoreszenz $F(t)$ mit der Apparatefunktion $IRF(t')$. Beschrieben wird dieser Prozess durch Gleichung 3.1:

$$I(t) = \int_{-\infty}^{\infty} IRF(t') \cdot F(t - t') dt' \quad (3.1)$$

wobei t' ein Integrationsparameter ist. Das obere Integrationsintervall kann zu t vereinfacht werden, da vor dem Anregungspuls kein Fluoreszenzsignal vorliegt und der Laserpuls die Zeit t bestimmt:

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \cdot F(t - t') dt' \quad (3.2)$$

Der Einfluss der Apparatefunktion (IRF) ist besonders bei kurzen Lebensdauern unter zwei Nanosekunden stark ausgeprägt. Das folgende Beispiel soll diesen Effekt verdeutlichen: In Abbildung 3.6 ist eine simulierte monoexponentielle Abklingkurve mit einer Fluoreszenzlebensdauer von 500 ps dargestellt. Diese Funktion wurde anschließend mit einer 250 ps IRF gefaltet. Daraus resultiert die rote Kurve in Abbildung 3.6. Solch eine Kurve könnte durchaus realistisch gemessen werden. Das Vernachlässigen der IRF würde bei einem monoexponentiellem Fit eine Fluoreszenzlebensdauer von 638 ps ergeben. Dadurch würde sich eine Abweichung von rund 28 % im Gegensatz zu der wahren Lebensdauer ergeben. Es ist also grundsätzlich immer besser die IRF des verwendeten Systems zu kennen und in die Auswertungen mit einzubeziehen. Die Apparatefunktion wurde direkt in die Fitprozeduren für

die verschiedenen Messungen mit eingefügt und berücksichtigt. In den folgenden Kapiteln wird darauf genauer eingegangen.

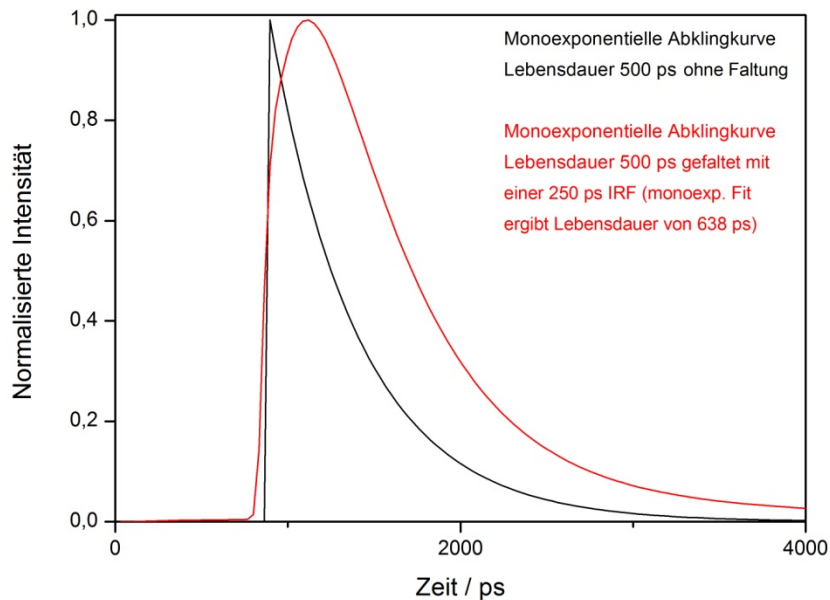


Abbildung 3.6: Der Einfluss der IRF. Die schwarze Kurve stellt eine monoexponentielle Abklingkurve dar, welche anschließend mit einer 250 ps IRF gefaltet wird. Das Ergebnis ist in Form der roten Kurve dargestellt. Beide Kurven wurden auf 1 normiert. Ein monoexponentieller Fit würde dann eine Lebensdauer von 638 ps ergeben.

Die Apparatefunktion muss experimentell bestimmt werden, da sie für jeden Aufbau und jedes Bauteil variabel ist. Prinzipiell verändert jedes Objekt im Pfad der Fluoreszenz die IRF, aber hauptsächlich ist sie abhängig von den verwendeten Detektoren. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die IRF eines Aufbaus zu bestimmen^[34]. Wichtig für alle Methoden ist die Erzeugung eines sehr kurzen Pulses, der unter der zeitlichen Auflösungsgrenze des verwendeten Systems liegt. Das resultierende Signal ist dann nur noch von dem System abhängig und gibt die Apparatefunktion wieder. Zur Bestimmung der IRF für die biologischen Experimente am Mikroskop in dieser Arbeit wurde die Erzeugung von ultrakurzen Weißlichtpulsen benutzt. Dazu werden 800 nm Pulse eines Femtosekundenlasers in eine Paraffinlösung fokussiert^[35]. Dadurch werden mikroskopisch kleine Luftblasen erzeugt, an deren Phasengrenze nicht-lineare Prozesse stattfinden, welche zur Weißlichterzeugung führen. Die erzeugten Pulse sind weiterhin sehr kurz und enthalten Wellenlängen über eine Breite von 350 bis 600 nm. Da die IRF wellenlängenabhängig ist, wurde das erhaltene Weißlicht durch die gleichen Fluoreszenzfilter gefiltert, welche auch für die Experimente verwendet wurden, um die am besten geeignete IRF zu ermitteln. Die ermittelte IRF ist in Abbildung 3.7 gezeigt und besitzt eine Halbwertsbreite (FWHM) von 72

ps. Sie stimmt mit der gemessenen IRF für 470 nm des Herstellers überein^[36]. Da die IRF abhängig von der Wellenlänge ist, muss sie für jede Messung, bei der sich die Fluoreszenzwellenlänge ändert, neu bestimmt werden.

Für die Polarisationsexperimente konnte diese Methode zur Ermittlung der IRF nicht verwendet werden. Der Grund dafür ist die schwächere Fokussierung der verwendeten Objektive, so dass keine Weißlichterzeugung beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Streuung von Laserpulsen an einer Suspension verwendet. Als Suspension wurde zum Einen eine stark verdünnte Kieselgel-Wasser-Mischung und zum Anderen verdünnte Milch verwendet. Beide Suspensionen lieferten identische Ergebnisse. Die Wellenlänge des Lasers wurde auf 700 nm eingestellt und durch einen β -Bariumborat-Kristall (BBO) auf 350 nm frequenzverdoppelt. Die Wellenlänge entsprach somit in etwa der Fluoreszenzwellenlänge der untersuchten Moleküle. Der frequenzverdoppelte Laserstrahl wurde durch einen Graufilter abgeschwächt und auf die Suspension fokussiert. Anschließend wurde das gestreute Laserlicht durch eine Sammellinse gebündelt und durch die verwendeten Emissionsfilter auf die Detektoren fokussiert. Die erhaltene Apparatefunktion war für beide Detektoren nahezu identisch und besitzt eine Halbwertsbreite von 256 ps. Sie ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

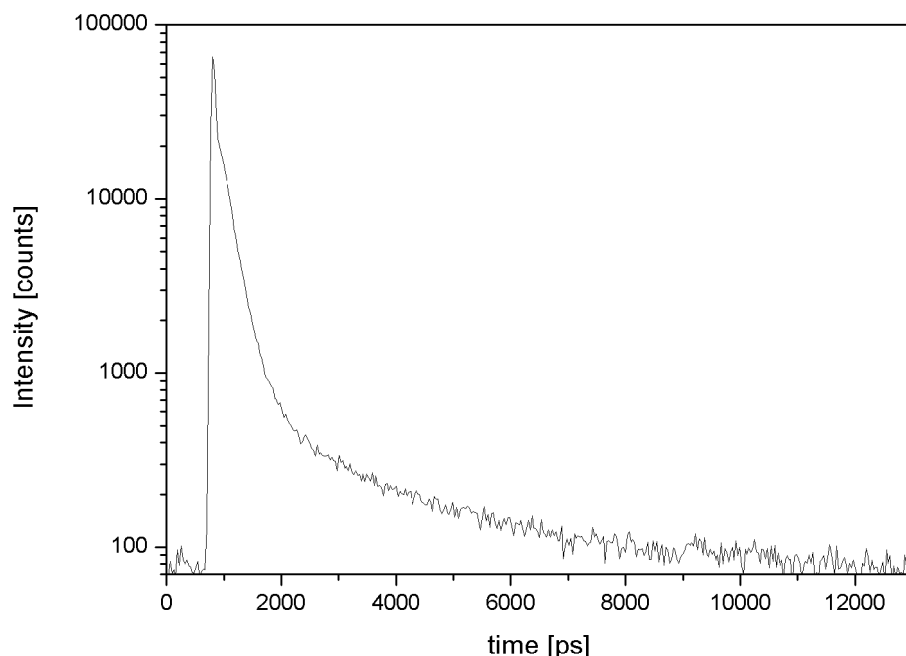


Abbildung 3.7: IRF für die Experimente am Mikroskop. FWHM = 72 ps. Es wurde eine logarithmische Skala für die Y-Achse verwendet. Aufgenommen bei einer Kanalbreite von 32 ps pro Kanal.

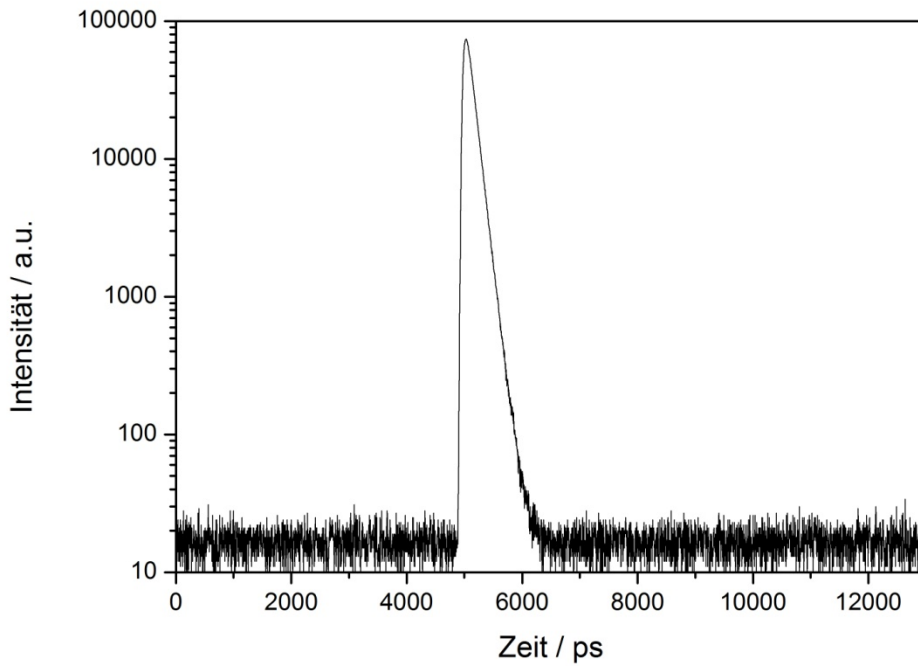


Abbildung 3.8: IRF für die Polarisationsexperimente. FWHM = 256 ps. Es wurde eine logarithmische Skala für die Y-Achse verwendet. Aufgenommen bei einer Kanalbreite von 4 ps pro Kanal.

3.3.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer und Generierung einer Fluoreszenzbildes

Aufgrund von intermolekularen Bindungen können natürliche Fluorophore in verschiedenen Formen auftreten, welche jede für sich eine charakteristische Fluoreszenzlebensdauer τ_j besitzen kann. Aus diesem Grund kann das Fluoreszenzsignal $F(t)$ als eine Summe von Exponentialfunktionen ausgedrückt werden, bei der jede Fluoreszenzabklingkurve für ein einzelnes Fluorophor steht. Dadurch ist es möglich eine Variation von mehreren Fluoreszenzlebensdauern aus der Messung zu extrahieren, wie in Gleichung 3.3 gezeigt:

$$I_{ik}(t) = I_0 + \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \cdot \sum_{j=1}^n a_j(i,k) \cdot e^{\frac{-(t-t')}{\tau_j}} dt' \quad (3.3)$$

Dabei ist I_0 das Hintergrundsignal und $a_j(i,k)$ die Intensitätsbeiträge der einzelnen Fluoreszenzlebensdauern τ_j zur Gesamtintensität $I_{ik}(t)$ für jeden Pixel (i,k) des Fluoreszenzbildes.

Im ersten Schritt der Auswertung der Sporenmessungen wurde ein globaler tri-exponentieller Fit ($n=3$; Gleichung 3.3) der Intensität $I(t) = \sum_{i,k} I_{ik}(t)$ durchgeführt, um die drei relevanten Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 zu bestimmen. Die tri-exponentielle Form wurde aufgrund der zu untersuchenden Moleküle und derer zu erwartenden Lebensdauern benutzt: τ_1 eine sehr kurze Lebensdauer von dem Melanin der Zellwand der Sporen, τ_2 eine längere Lebensdauer für das frei vorkommende NAD(P)H und τ_3 eine sehr lange Lebensdauer für das proteingebundene NAD(P)H.

Im Anschluss an die Bestimmung der drei globalen Fluoreszenzlebensdauern wurde ein lokaler Fit für jeden Pixel durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls Gleichung 3.3 benutzt und die IRF berücksichtigt. Der Unterschied bestand hierbei in der Fixierung der Fluoreszenzlebensdauern als feste Parameter. Dadurch konnten die Beiträge $a_j(ik)$ jeder einzelnen Fluoreszenzlebensdauer zum gesamten Fluoreszenzsignal ermittelt werden und dass für jeden einzelnen Pixel des Fluoreszenzbildes. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden in Form eines normalisierten Fluoreszenzbildes abgebildet, in dem die drei unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern mit drei unterschiedlichen Farben dargestellt wurden, um die Lokalisierung der natürlichen Fluorophore, Melanin, freies NAD(P)H und proteingebundenes NAD(P)H zu ermöglichen.

3.3.3 Bestimmung der molekularen Parameter mit Hilfe polarisationsabhängiger Fluoreszenz

Für ein komplettes Polarisationsexperiment müssen insgesamt 26 Einzelmessungen durchgeführt werden. Durch die Verwendung von zwei Detektoren für die jeweiligen Polarisationskanäle reduziert sich diese Zahl auf 13, da immer zwei Datensätze parallel aufgenommen werden können. Vier Messungen sind grundsätzlich nötig, um die notwendigen Polarisationskombinationen laut dem Schema in Abbildung 3.5 abzudecken. Hinzu kommen die acht Messungen für die Bestimmung des Hintergrunds, welcher für jede Polarisationskombination zusätzlich bestimmt werden muss. Der Hintergrund setzt sich hierbei aus den einzelnen Konkurrenzprozessen der Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung zusammen: der Zwei- und Dreiphotonenanregung. Bestimmt werden kann der Hintergrund durch jeweilige Blockierung einer der beiden Laserstrahlen und Aufnahme der resultierenden Fluoreszenz. Abbildung 3.4 zeigte bereits, dass der Hintergrund ungefähr $< 5 \%$ des

Gesamtsignals ausmacht. Die letzte Messung stellt die Dunkelmessung dar, bei der beide Laserstrahlen geblockt werden und nur das restliche Hintergrundleuchten des Raumes detektiert wird. Anschließend werden sämtliche Hintergrundsignale von dem Zweifarben-Zweiphotonen-Signal abgezogen, so dass nur acht experimentelle Kurven für die Bestimmung der molekularen Parameter genutzt werden können.

Unter Berücksichtigung der IRF wurden folgende Fitfunktionen an die Datensätze angepasst:

$$\begin{aligned}
 I_{YYx}(t) &= G \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{YY}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 - r_1(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{YYy}(t) &= \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{YY}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 + 2r_1(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{RRy}(t) &= \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{RR}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 - r_2(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{RRx}(t) &= G \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{RR}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 + 2r_2(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{RLy}(t) &= \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{RL}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 - r_3(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{RLx}(t) &= G \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{RL}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 + 2r_3(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{YZx}(t) &= G \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{YZ}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 + r_4(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt' \\
 I_{YZy}(t) &= \int_{-\infty}^t IRF(t') I_{YZ}(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_f}} [1 + r_5(0) e^{-\frac{t-t'}{\tau_{rot}}}] dt'
 \end{aligned} \tag{3.4-3.11}$$

Dabei wurde folgender Code für die Zuordnung der Intensitäten verwendet: Der erste Buchstabe steht für die Polarisation des roten Strahls, der zweite für die Polarisation des blauen Strahls und der dritte für die Polarisation der detektierten Fluoreszenz. I_{RLy} würde dann zum Beispiel bedeuten, dass zur Anregung der rote Strahl rechtszirkular und der blaue linkszirkular polarisiert sind und das die in Y-Richtung polarisierte, Fluoreszenz detektiert wird. Allgemein stehen die Indizes X, Y und Z für die lineare Polarisationen entlang der experimentellen Koordinatenachsen und R bzw. L für die zirkularen Polarisationen. Das G in Gleichung 3.4 bis 3.11 ist ein Faktor zum Ausgleich der Detektionseffizienz der beiden verwendeten Detektoren. r_1 bis r_5 sind die jeweilige Anisotropie. τ_f ist die Fluoreszenzlebensdauer und τ_{rot} die Rotationskorrelationszeit. Die Rotationskorrelationszeit beschreibt die Veränderung der Rotation eines Moleküls mit der Zeit, was mit der Diffusion des Moleküls gleichzusetzen ist. Bestimmt werden kann sie durch Auftragung der Anisotropie

gegen die Zeit. Beschrieben wird dadurch die Depolarisation der Fluoreszenz. Es ergibt sich ein exponentieller Zusammenhang analog zur Fluoreszenzlebensdauer:

$$r(t) = \sum_{j=1}^5 r_j \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{rotj}}} \quad (3.12)$$

Die Anzahl der möglichen Rotationskorrelationszeiten pro Molekül ist auf 5 beschränkt^[37, 38].

Die Gleichungen 3.4-3.11 ergeben sich aus der allgemeinen Formel zur Berechnung der Anisotropie:

$$r_P = \frac{I_{Px} - I_{Py}}{I_{Px} + 2I_{Py}} \quad (3.13)$$

Der Index P steht dabei für YY, RR und RL. Durch Umstellen und Einsetzen der totalen Intensität $I_P(t) = \frac{1}{3}(I_{Px} + 2I_{Py})$ ergibt sich daraus:

$$\begin{aligned} I_{Px} &= I_P(t) [1 + 2r_P(t)] \\ I_{Py} &= I_P(t) [1 - r_P(t)] \end{aligned} \quad (3.14-3.15)$$

Es sollte darauf geachtet werden, dass sich die Indizes x und y für den Fall P = YY in den Gleichungen 3.14 und 3.15 vertauschen. Dieser Ansatz wurde zuerst von Crutzen verwendet^[39]. Für die linear gekreuzte Anregung müssen zwei alternative Gleichungen verwendet werden:

$$\begin{aligned} I_{YZx} &= I_{YZ}(t) [1 + r_{YZx}(t)] \\ I_{YZy} &= I_{YZ}(t) [1 + r_{YZy}(t)] \end{aligned} \quad (3.16-3.17)$$

Die beiden partiellen Anisotropien r_{YZx} und r_{YZy} müssen eingeführt werden, da eine gemeinsame Betrachtung, wie im vorherigen Fall, nicht möglich ist. Der Grund dafür liegt in der Anregung mit senkrecht zueinander stehenden Polarisierungen, welche unterschiedliche Anisotropien hervorbringen können.

Zur Bestimmung der molekularen Parameter müssen die Intensitäten und Anisotropien der einzelnen Messungen zum Zeitpunkt $t=0$ bestimmt werden. Dazu wurde unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.4 bis 3.11 ein globaler Fit über alle acht Messungen gleichzeitig durchgeführt. Da die Fluoreszenzlebensdauer sowie die Rotationskorrelationszeit

unabhängig von der Polarisierung sind, wurden sie als fixe globale Parameter für den Fit verwendet. Mit den Ergebnissen des Fits und mit Hilfe von Tabelle 2.1 können dann die M-Parameter durch Lösung eines überbestimmten Gleichungssystems, bestehend aus acht Gleichungen und sieben Unbekannten, bestimmt werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der zeitaufgelösten Zweiphotonen-Messungen an *Aspergillus Ochraceus* sowie die zeit- und polarisationsaufgelösten Zweifarben-Zweiphotonen-Messungen präsentiert.

4.1 Zweiphotonenmikroskopie von *Aspergillus Ochraceus*

Es gibt verschiedene Herausforderungen bei zeitaufgelösten Messungen von biologischen Proben. Die GröÖte ist die vielfältige Variation der molekularen Umgebung der natürlichen Fluorophore. Aus diesem Grund ist es möglich, sehr komplexe Abklingverhalten der Fluoreszenz zu beobachten. Melanin zeigt beispielsweise ein sehr vielschichtiges Fluoreszenzverhalten. So berichten Forest et al. bis zu vier verschiedene Fluoreszenzlebensdauern für Melanin^[40]. Allgemein besitzt Melanin eine sehr kurze dominante Fluoreszenzlebensdauer von etwa 30 bis 40 ps, wie Ehlers et al. bei der Untersuchung von Haarproben festgestellt haben^[41]. Die Fluoreszenzlebensdauern für freies und enzymgebundenes NAD(P)H wurden mit um die 500 ps für freies und um die 3 ns für gebundenes NAD(P)H publiziert, wobei es je nach vorliegenden Bedingungen in den Zellen Abweichungen gibt^[18, 20, 42-44]. Diese Werte passen sehr gut zu der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen. Sie sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Ergebnisse des globalen Fittes. Die Indizes 1,2 und 3 stehen für Melanin, freies und enzymgebundenes NAD(P)H.

Index des Parameter j	Fluoreszenz-lebensdauer τ_j /ps	Intensitätsanteil A_j / 10^4 counts
1	32 ± 10	175 ± 25
2	490 ± 140	$2,00 \pm 0,60$
3	3530 ± 190	$1,13 \pm 0,10$

Der erste Wert gehört zum Melanin. Die quantitative Bestimmung dieses Wertes für das Melanin ist schwierig, da die zeitliche Auflösung des verwendeten Detektors 72 ps bei den Wellenlängen des verwendeten Emissionsfilters (460 ± 80 nm) beträgt. Obwohl der τ_1 Wert von 32 ps damit unter der zeitlichen Auflösung des experimentellen Aufbaus liegt, kann eine

Genauigkeit von 10 ps für diese Lebensdauer erreicht werden, da die Vorwärtsfaltung aus Gleichung 3.3 gefittet wurde. Allgemein hängt die Genauigkeit signifikant von der zeitlichen Auflösung des Aufbaus, der Genauigkeit der IRF und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ab. In diesem Fall wurden mehr als hundert Proben untersucht und die Statistik zeigte keine größere Variation der kürzesten Lebensdauer als 10 ps.

Der zweite Wert gehört zum freien NAD(P)H und der dritte zum enzymgebundenen NAD(P)H. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Lebensdauer τ_3 von dem Protein bzw. den Proteinen abhängt, an denen das NAD(P)H gebunden ist. Aufgrund der großen Anzahl von Proteinen, die für diese Bindung in Frage kommen, ist es unmöglich diese mit den Möglichkeiten, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, zu identifizieren. Trotzdem ist es möglich, die Regionen zu lokalisieren, in denen erhöhte Konzentrationen von gebundenem NAD(P)H vorkommen und das mit subzellulärer Auflösung.

Der globale Fit und die Residuen sind in Abbildung 4.1 gezeigt. Es ist leicht zu erkennen, dass der tri-exponentielle Fit sehr gut an die Daten angepasst werden kann. Nur im Bereich des Anstiegs gibt es leichte Abweichungen, die aber unter einem Prozent liegen. Diese Abweichungen kommen durch die extrem kurze erste Lebensdauer und die Faltung mit der IRF zu Stande und sind in einem akzeptablen Bereich.

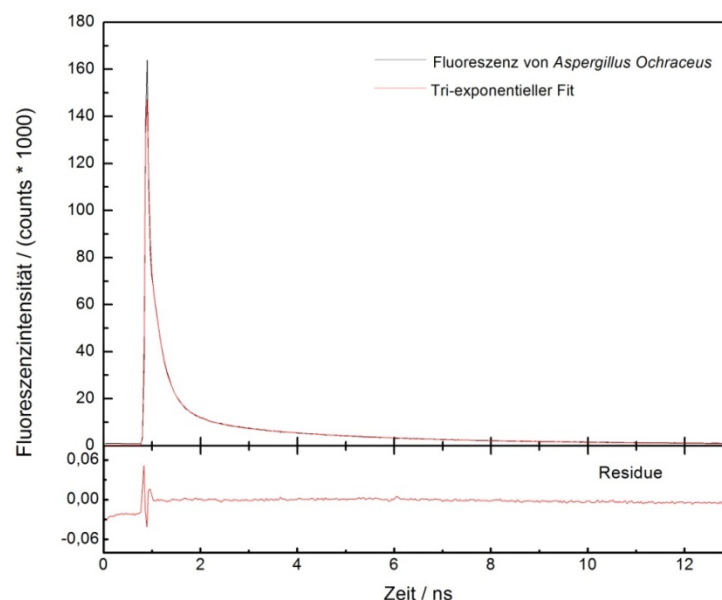


Abbildung 4.1: Das Fluoreszenzsignal von *Aspergillus Ochraceus* und der globale tri-exponentielle Fit. Im unteren Bereich ist die Residue des Fits dargestellt. Nur im Bereich des Anstiegs gibt es kleine Abweichungen, die nicht weiter ins Gewicht fallen. Die kleineren Abweichungen im Bereich > 4000 ps ergeben sich durch das konstante Hintergrundsignal I_0 (Gleichung 3.3).

Abbildung 4.2 zeigt eine typische Fluoreszenzabklingkurve einer einzelnen Spore von *Aspergillus Ochraceus* und wie die drei Fluoreszenzlebensdauern dazu beitragen.

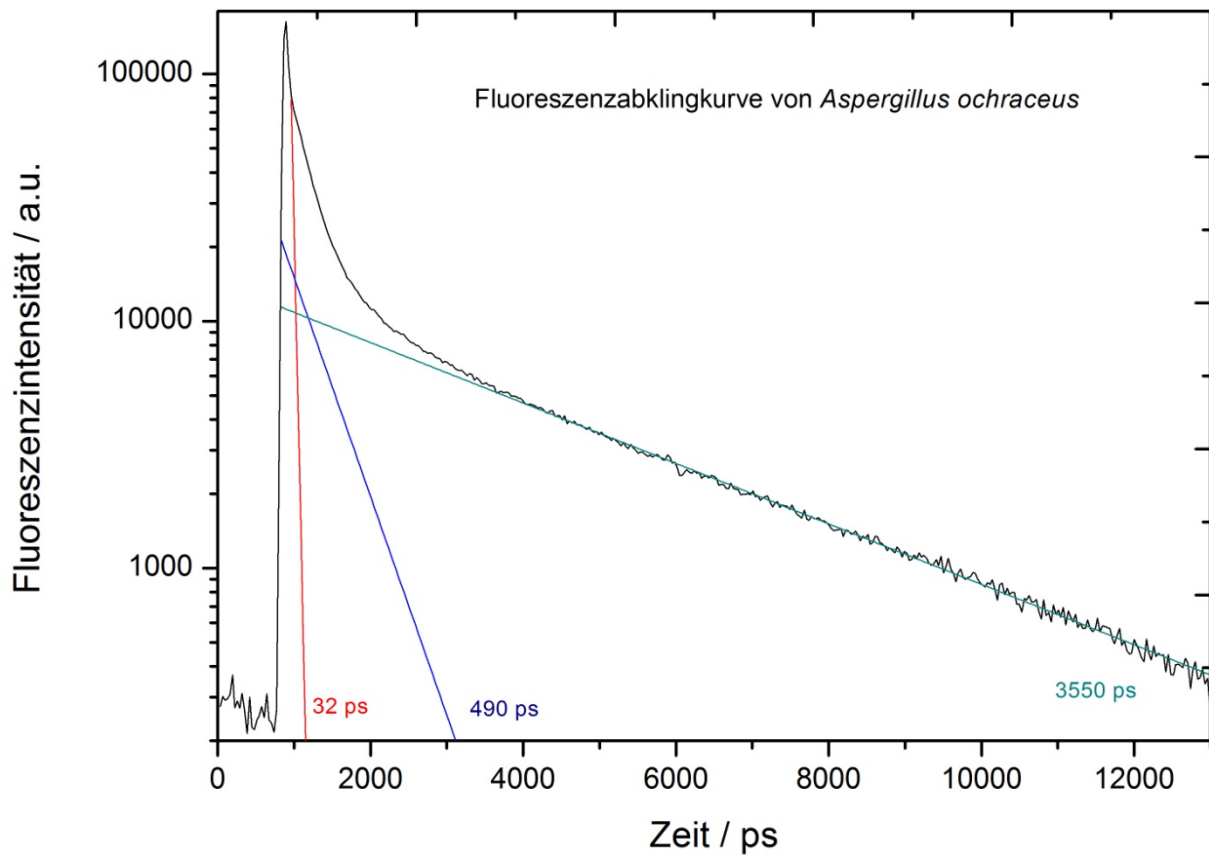


Abbildung 4.2: Fluoreszenzabklingkurve einer einzelnen Spore von *Aspergillus Ochraceus* und wie die drei Lebensdauern dazu beitragen. Durch die logarithmische Auftragung kommt die Dominanz der kurzen Lebensdauer gut zum Vorschein. Die Fluoreszenz wurde um das konstante Hintergrundsignal I_0 (Gleichung 3.3) bereits korrigiert.

Die kürzeste Fluoreszenzlebensdauer τ_1 kann nur unmittelbar nach dem Anregungspuls detektiert werden. Sie ist in einer ähnlichen Region mit der zeitlichen Auflösungsgrenze des experimentellen Aufbaus. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die IRF zu berücksichtigen, wie bereits an Gleichung 3.3 gezeigt wurde. Die Lebensdauern τ_2 und τ_3 sind weniger stark von der IRF abhängig, da sie länger als die Halbwertsbreite der IRF sind. Wie aber bereits in Kapitel 3.2 gezeigt, ist es trotzdem wichtig, die IRF für eine genaue quantitative Bestimmung von Lebensdauern zu beachten. Die Abbildung 4.2 wurde um das Hintergrundsignal I_0 korrigiert. Dieses wird während der Fittingprozedur nach Gleichung 3.3 mit einbezogen.

Eine weitere wichtige Größe ist A_j in Tabelle 4.1, welche die Summe von allen Amplituden $a_j(i,k)$ über das gesamte Fluoreszenzbild darstellt. Mit Hilfe dieser Größe ist es möglich, die relativen Fluoreszenzanteile von Melanin, freien NAD(P)H und gebundenem NAD(P)H am gesamten Fluoreszenzsignal zu bestimmen und anschaulich zu präsentieren (Abbildung 4.4).

$$A_j = \sum_{i,k} a_j(i,k) \quad (4.1)$$

Die Ergebnisse der Auswertung der A_j in Tabelle 4.1 zeigen, dass der Anteil A_1 der kürzesten Fluoreszenzlebensdauer τ_1 zwei Größenordnungen größer ist als der von A_2 oder A_3 :

$$A_1 / \sum_{j=1}^3 A_j = 0,99 . \quad (4.2)$$

Eine der Konzentration proportionale Größe ist der Fluoreszenzanteil, welcher sich aus der Amplitude $a_j(i,k)$ und der Fluoreszenzlebensdauer berechnen lässt^[45]:

$$F_j(i,k) = \frac{a_j(i,k) \cdot \tau_j(i,k)}{\sum_j a_j(i,k) \cdot \tau_j(i,k)} \quad (4.3)$$

Nichtsdestotrotz tritt diese Fluoreszenz hauptsächlich in der Zellwand auf. Arcangeli et al. haben ein ähnliches Verhalten bei dem antarktischen Pilz *Arthrobotrys Ferox* beobachtet^[46]. Sie berichteten, dass die Fluorophore der Zellwandmembran für die höhere Intensität der Wand im Kontrast zu den inneren Regionen verantwortlich sind, waren aber nicht in der Lage ihre Beobachtungen zu spezifizieren oder Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen. Weitere Untersuchungen an der Zellwand haben gezeigt, dass die Lebensdauer τ_1 diesen Bereich dominiert und es konnten dort keine Hinweise auf NAD(P)H gefunden werden.

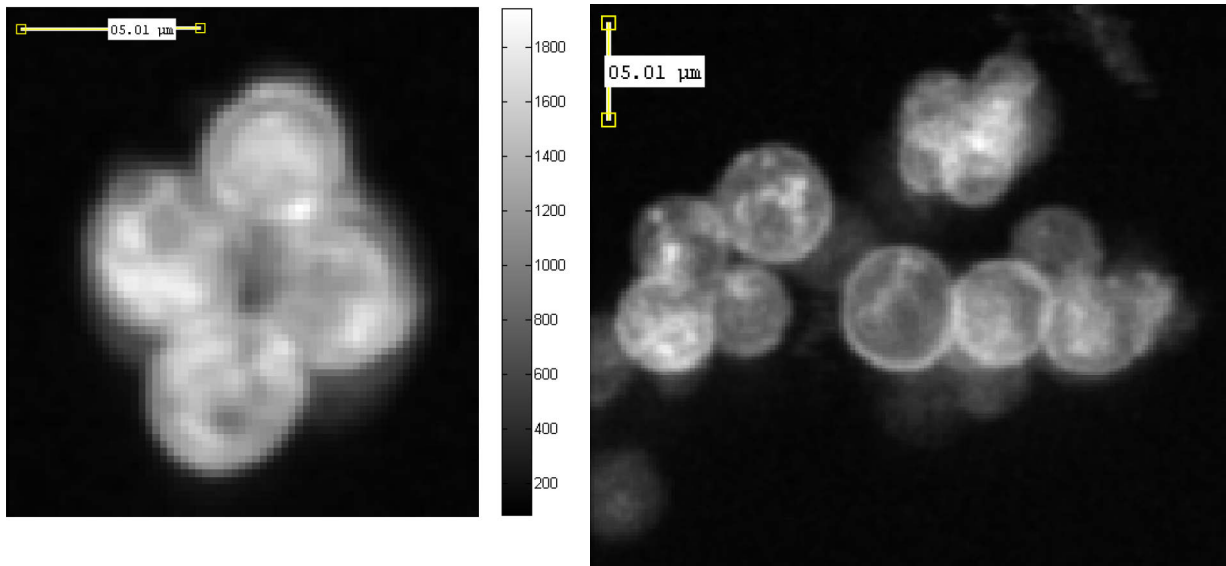


Abbildung 4.3: Intensitätsbilder der Fluoreszenz von zwei verschiedenen Proben von *Aspergillus Ochraceus*. Es handelt sich dabei um Proben die auf Malzextraktagar aufgezogen wurden.

Abbildung 4.3 zeigt die Fluoreszenzintensität von verschiedenen Proben von *Aspergillus Ochraceus*. Die linke Seite präsentiert vier Sporen, während auf der rechten Seite mehrere Sporen aus einem anderen Bereich der Probe mit einer niedrigeren Auflösung aufgenommen

wurden. Es ist zu erkennen, dass es unter der hellen Fokusebene weitere Schichten von Sporen gibt. Während es möglich ist im linken Bild einzelne Sporen klar räumlich abzugrenzen, ist dies im rechten Bild eher schwierig. Eine viel bessere räumliche Auflösung kann durch ein Fluoreszenzlebensdauerbild erreicht werden, wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist. Es wurde ein RGB Farbcode verwendet, wobei rot die kürzeste Fluoreszenzlebensdauer τ_1 (Melanin), grün die mittlere Fluoreszenzlebensdauer τ_2 (freies NAD(P)H) und blau die längste Fluoreszenzlebensdauer τ_3 (proteingebundenes NAD(P)H) darstellt. Die Verteilung der A_j ($j=1,2,3$) wurde individuell über alle Pixel der Bilder normalisiert, um eine bessere Visualisierung der Melanin- und NAD(P)H-Verteilung innerhalb der Spore zu erreichen. Das Melanin (rot) befindet sich hauptsächlich in der Zellwand, während das freie NAD(P)H (grün) und das gebundene NAD(P)H (blau) sich oft gegenseitig überlappen.

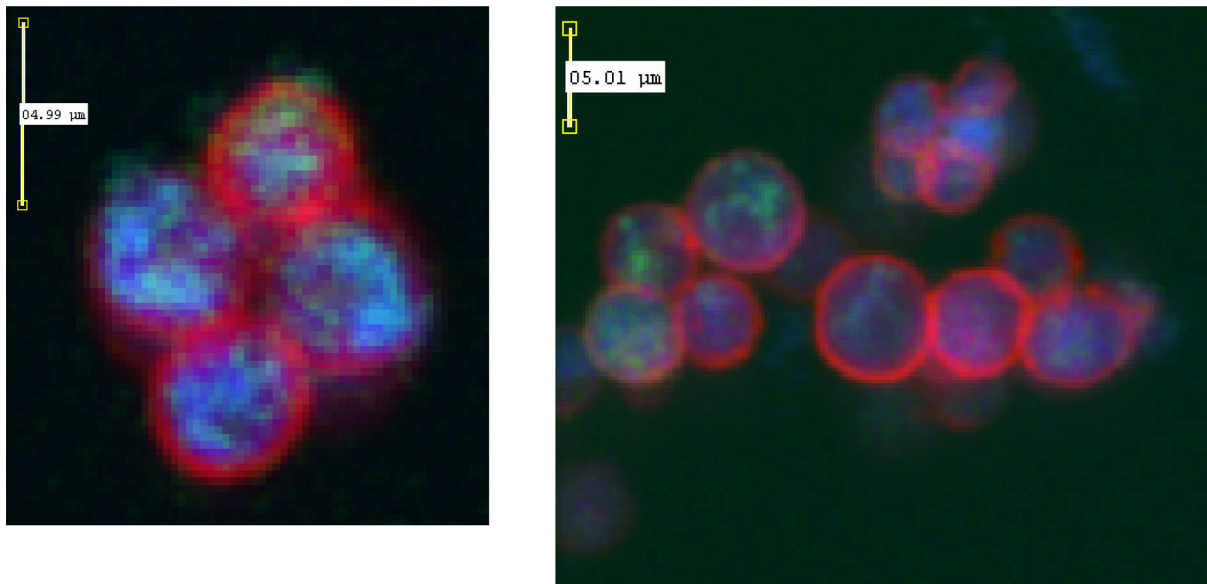


Abbildung 4.4: Fluoreszenzlebensdauerbilder von *Aspergillus Ochraceus*. Es wurde ein RGB Farbcode verwendet wobei rot die Fluoreszenzlebensdauer des Melanin (τ_1), grün die Fluoreszenzlebensdauer von freiem NAD(P)H (τ_2) und blau die Fluoreszenzlebensdauer von proteingebundenem NAD(P)H (τ_3) darstellt.

Aus diesen Bildern ist es darum recht schwierig, die genaue Verteilung des NAD(P)H innerhalb der Spore wahrzunehmen. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Bilder aus den gefitteten Daten generiert. Sie zeigen die einzelnen Verteilungen von freiem ($a_1(i,k)=a_3(i,k)=0; a_2(i,k)$) und enzymgebundenem NAD(P)H ($a_1(i,k)=a_2(i,k)=0; a_3(i,k)$). Beide Bilder sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Es wurde ein neuer Farbcode benutzt, um die Visualisierung noch zu verbessern. Abbildung 4.5 deutet daraufhin, dass das NAD(P)H nicht gleich verteilt ist. Es gibt kleine Bereiche in denen das enzymgebundene NAD(P)H klar dominiert, während es in anderen Bereichen der Spore kaum gefunden wird. Es ist zwar nach wie vor nicht möglich zwischen den Proteinen zu unterscheiden, welche das NAD(P)H

binden, aber es ist möglich mit der eingesetzten Methode diese Proteine innerhalb der Spore zu lokalisieren.

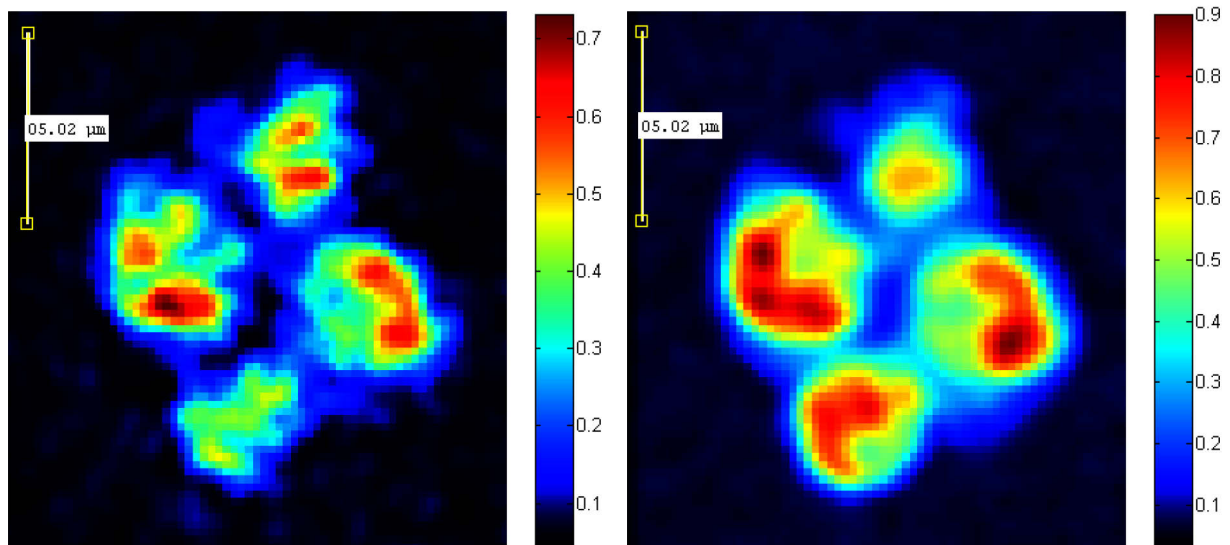


Abbildung 4.5: links: Verteilung von freiem NAD(P)H; rechts: Verteilung von enzymgebundenem NAD(P)H

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit, das Entwickeln einer Methode zur Untersuchung der Viabilität von Pilzsporen in Bezug auf die Umgebung während der Sporenbildung wurde mit Hilfe der gerade vorgestellten Techniken erreicht. Als Proben dienten dazu *Aspergillus Ochraceus* Sporen, welche auf Haferkleie-Agar (HK), Malzextrakt-Agar (MEA) und Weizenkleie-Agar (WK) gezüchtet wurden. Für jede Sorte gab es dann fünf verschiedene Proben: frisch geerntete, sieben Tage gelagerte, abgetötete, frisch geerntet gekeimte und gelagert gekeimte Sporen. Als Anmerkung sei erwähnt, dass abgetötete Sporen nach der Sterilisation nicht mehr zur Keimung in der Lage waren. Im Folgenden werden die Ergebnisse präsentiert und es schließt sich ein Vergleich der Nährmedien an.

Auf eine Betrachtung der Melanin-Fluoreszenz wird verzichtet, da die Fluoreszenz hauptsächlich in der Zellwand auftritt und keine signifikanten Unterschiede in den Fluoreszenzlebensdauern festgestellt werden konnten.

4.1.1 Vergleich der Sporen nach ihrer Herkunft (Nährböden)

Im Folgenden werden die Sporen nach ihrer Herkunft in Bezug auf ihre NAD(P)H-Fluoreszenzlebensdauern sowie deren Anteile an der NAD(P)H-Fluoreszenz diskutiert. Zu Übersichtszwecken sind in Tabelle 4.2 noch einmal alle Ergebnisse der Auswertung der FLIM-Daten der Sporen dargestellt.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Ergebnisse der Auswertung der FLIM-Daten der Sporen sortiert nach dem Nährmedium und dem entsprechenden Probenotyp; Gegenübergestellt werden die Fluoreszenzlebensdauern τ_1 bis τ_3 sowie der Amplitudenanteil und der Fluoreszenzanteil der dritten Fluoreszenzlebensdauer τ_3 an der Gesamtfluoreszenz des NAD(P)H.

Nährmedium	Typ	τ_1 / ps	τ_2 / ps	τ_3 / ps	Amplitudenanteil $a_{3(i,k)}$ an gebundenem NAD(P)H / %	Fluoreszenzanteil $F_{3(i,k)}$ an gebundenem NAD(P)H / %
HK	frisch	44 ± 5	729 ± 42	4086 ± 43	10 ± 1	38 ± 2
	gelagert	38 ± 3	543 ± 20	3004 ± 109	17 ± 1,4	54 ± 5
	abgetötet	42 ± 5	547 ± 7	3136 ± 175	8 ± 0,6	32 ± 1
	frisch gekeimt	27 ± 2	479 ± 46	3523 ± 520	19 ± 3	63 ± 3
	gelagert gekeimt	12 ± 10	474 ± 142	3680 ± 55	8 ± 0,9	41 ± 3
MEA	frisch	14 ± 9	636 ± 58	3510 ± 242	8 ± 1,6	31 ± 8
	gelagert	30 ± 3	421 ± 6	2762 ± 68	14 ± 1,8	51 ± 3
	abgetötet	7 ± 1	424 ± 23	2891 ± 271	6 ± 0,6	29 ± 1
	frisch gekeimt	31 ± 8	529 ± 52	3434 ± 160	22 ± 0,1	65 ± 3
	gelagert gekeimt	12 ± 6	521 ± 115	4072 ± 115	8 ± 4,2	38 ± 9
WK	frisch	26 ± 5	744 ± 28	3787 ± 131	14 ± 0,3	46 ± 1
	gelagert	19 ± 9	549 ± 62	3414 ± 579	14 ± 0,2	50 ± 7
	abgetötet	42 ± 3	660 ± 17	3831 ± 268	9 ± 0,4	37 ± 2
	frisch gekeimt	34 ± 16	544 ± 39	3848 ± 185	27 ± 7,7	72 ± 7
	gelagert gekeimt	13 ± 7	479 ± 24	3675 ± 24	22 ± 2,9	69 ± 5

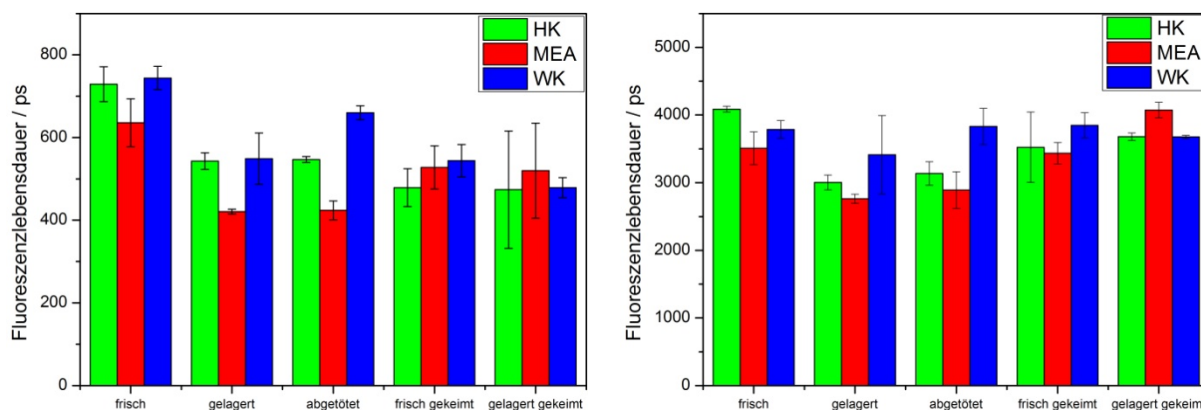


Abbildung 4.6: links: Die Fluoreszenzlebensdauern des freien NAD(P)H für die drei Probenarten HK, MEA und WK; rechts: Die Fluoreszenzlebensdauern des enzygebundenen NAD(P)H für die drei Probenarten HK, MEA und WK.

Allgemein betrachtet geben die Fluoreszenzlebensdauern des NAD(P)Hs Auskunft über ihre molekulare Umgebung. Für das freie NAD(P)H Molekül würde in Lösung nur eine Lebensdauer erwartet werden, vorausgesetzt es gibt keine Wechselwirkungen mit dem Solvens. Webb et al. berichten dagegen von zwei Lebensdauern und zwar 350 ps und 760 ps, wobei sich durch Einbeziehen der Anteile beider Lebensdauern an der Gesamtfluoreszenz eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von 444 ps ergibt^[47]. Der Grund dafür liegt in den beiden möglichen Konformeren des NAD(P)H. Es existiert ein gefaltetes Konformer, bei dem das Nicotinamid und die Adeninringe übereinander geschichtet sind sowie eine offene Form ohne interne Überlagerungen^[47]. Webb et al. haben keine Zuordnung der Fluoreszenzlebensdauern vorgenommen. Es ist aber sinnvoll, der gefalteten Form die längere Lebensdauer zuzuordnen, da diese stärker sterisch gehindert ist und sie somit eine längere Zeit braucht, die überschüssige Energie nach einer Anregung wieder abzugeben. In dieser Arbeit wurde keine Unterscheidung der Formen des freien NAD(P)Hs vorgenommen. Die einzige Möglichkeit dies zu tun, wäre ein tetra-exponentieller Fit der Messdaten, wofür im Allgemeinen aber Intensitäten nötig wären, die von natürlichen Fluorophoren nicht zu erreichen sind. Einen guten Überblick über Grenzen von exponentiellen Analysen in Bezug auf die Gesamtintensität sowie das Signal-zu-Rausch liefern Istratov und Vyvenko^[48].

Die linke Seite der Abbildung 4.6 stellt die Fluoreszenzlebensdauern des freien NAD(P)Hs in Abhängigkeit von den verwendeten Probentypen dar. Dabei wird zusätzlich nach den Nährböden unterschieden, auf denen sich die Sporen entwickelt haben. Auf der rechten Seite von Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse für das enzymgebundene NAD(P)H dargestellt. Auffällig ist die große Heterogenität der Daten. Die generelle Ursache für solche Abweichungen liegt in der Natur der untersuchten Proben. Es ist unmöglich eine komplett homogene Probe von Pilzsporen zu erzeugen, da jede Spore sich individuell entwickelt. Aus diesem Grund führt eine Aufsummierung sämtlicher Fluoreszenzintensitäten zu Mittelwerten, die je nach Region der untersuchten Probe und den lokalen Bedingungen variieren können. Außerdem besitzt NAD(P)H je nach molekularer Umgebung verschiedene Fluoreszenzlebensdauern. Gerade für das gebundene NAD(P)H variieren diese sehr stark, da es zahlreiche Proteine gibt, die mit dem NAD(P)H auf verschiedenste Weisen wechselwirken können und dadurch der angeregte Zustand in verschiedener Intensität stabilisiert wird. Die Lebensdauern für das gebundene NAD(P)H sind eher kritisch zu betrachten, da durch das sehr ähnliche Absorptions- und Emissionsverhalten von NADH und NADPH nicht genau unterschieden werden kann, ob gerade NADH oder NADPH beobachtet wird. Beide Moleküle spielen in völlig unterschiedlichen Prozessen innerhalb der Zelle eine Rolle und

interagieren mit verschiedenen Proteinen, wodurch eine zusätzliche Varianz der Fluoreszenzlebensdauer geschaffen wird^[10, 49]. Die Lebensdauern für das NAD(P)H (τ_2 und τ_3) liegen in den Regionen, die zuvor publiziert wurden und je nach Zellbedingungen variieren^[18, 20, 42-44, 47].

4.1.2 Freies NAD(P)H

Generell betrachtet, besitzen die Fluoreszenzlebensdauern für das freie NAD(P)H, bei frisch geernteten Sporen, die größten Werte. Die Werte liegen in einem Bereich von 580 ps bis 770 ps. Aufgrund der großen Standardabweichungen ist hier keine weitere Aussage in Bezug auf die Nährböden möglich. Die frisch gekeimten Sporen weisen dahingegen deutlich kürzere Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von 430 ps bis 580 ps auf. Auch in diesem Fall ist keine Differenz entsprechend der Nährböden gegeben. Anders verhält es sich im Fall der gelagerten Sporen. Die auf Malzextraktagar gewachsenen Sporen weisen hier eine deutlich niedrigere Fluoreszenzlebensdauer (420 ps) für das freie NAD(P)H auf als die anderen beiden Spezies (490 ps bis 610 ps). Insgesamt lässt sich für die gelagerten Sporen in Bezug auf die frischen Sporen eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer des freien NAD(P)Hs erkennen. Daraus lässt sich auf einen größeren Anteil der offenen Form im Gegensatz zur gefalteten Form des freien NAD(P)Hs schließen. Dies deutet auf eine Veränderung des Metabolismus während des Prozesses der Lagerung hin. Im Falle der Keimung im Anschluss an die Lagerung lassen sich keine konkreten Trends erkennen, da die Standardabweichungen zu große Werte annehmen. Die großen Abweichungen für die MEA- und HK-Sporen deuten jedoch auf eine gesteigerte Heterogenität hin. Es scheint, als wären einige Sporen aufgrund der Lagerung in unterschiedlich starker Art und Weise an der Keimung gehindert. Die geringsten Abweichungen für die Fluoreszenzlebensdauer des freien NAD(P)Hs treten für die abgetöteten Sporen auf. Dies weist zum Einen auf eine gesteigerte Homogenität der Proben hin und gibt zum Anderen einen ersten Hinweis auf eine unterschiedliche Entwicklung der Sporen in Bezug auf ihre Nährböden. Für die MEA-Sporen liegen die Werte im Bereich von 400 ps bis 450 ps und sind damit die niedrigsten im vorliegenden Experiment. Die Werte für die HK-Sporen bilden mit 540 ps bis 560 ps den mittleren Bereich aus, während die Werte für die WK-Sporen mit 640 ps bis 680 ps die längsten Fluoreszenzlebensdauern für das freie NAD(P)H darstellen. Interessant ist, dass es in diesem Fall zum Einen klare Abgrenzungen gibt und offensichtlich nicht das komplette freie NAD(P)H in einer offenen Form trotz des

Zelltodes vorliegt und zum Anderen die Daten sehr homogen sind, also sich alle Sporen innerhalb einer Probe gleich verhalten.

4.1.3 Enzymgebundenes NAD(P)H

Im Fall der frisch geernteten Sporen ist die Fluoreszenzlebensdauer des gebundenen NAD(P)Hs für die HK-Sporen mit Werten zwischen 4 ns bis 4,1 ns länger als für die anderen beiden Proben (MEA: 3,3 ns bis 3,8 ns; WK: 3,6 ns bis 3,9 ns). Diese Werte deuten auf unterschiedliche Enzymkonzentrationen in den Sporen, mit Blick auf die Nährböden, hin. Zur Veränderung der Fluoreszenzlebensdauern sind nicht zwingend verschiedene Enzyme nötig, auch wenn dass der Fall sein könnte. Es ist ausreichend, wenn die Konzentrationen der einzelnen Enzyme in einer Spore variieren und somit die Fluoreszenz des NAD(P)Hs verschieden stark beeinflusst wird. Eine anschließende Keimung der frischen Sporen bewirkt keine signifikante Änderung der Fluoreszenzlebensdauern. Dies ändert sich im Fall der gelagerten HK- und MEA-Sporen. Die MEA-Sporen weisen hier mit 2,7 ns bis 2,8 ns einen deutlich geringeren Wert auf als es bei den beiden vorangegangenen. Mit Werten von 2,9 ns bis 3,1 ns für die HK-Sporen liegt in diesem Fall eine Veränderung von grob einer Nanosekunde im Gegensatz zu den frischen HK-Sporen vor. Diese Unterschiede sind so groß, dass Konzentrationsveränderungen der Enzyme in einem extremen Maßstab ablaufen müssen oder ein komplett anderer Metabolismus während der Lagerung abläuft. An diesem Punkt wären zusätzliche Messungen mit Vergleichsproben in bekannten Systemen nötig, um den Sachverhalt zu klären. Die großen Abweichungen im Fall der WK-Sporen deuten auf eine große Heterogenität innerhalb der Proben hin und lassen keine Aussage über mögliche Trends zu. Interessant sind die Daten für die gelagerten und anschließend gekeimten Sporen. Die Abweichungen sind in diesen Fällen sehr gering und eine Zunahme der Fluoreszenzlebensdauern des gebundenen NAD(P)Hs ist zu verzeichnen. Die Werte für die HK- und WK-Sporen liegen mit Werten von 3,6 ns bis 3,7 ns im gleichen Bereich. Die MEA-Sporen zeigen mit 4 ns bis 4,1 ns erhöhte Lebensdauern. Aus den bisher betrachteten Daten wird deutlich, dass es mindestens zwei verschiedene Arten des Metabolismus innerhalb der Sporen geben muss. Anscheinend existiert ein Metabolismus, der während der Entwicklung der Sporen abläuft und ein anderer für den Fall der Lagerung. Der Entwicklungs-metabolismus findet sich in frisch geernteten Sporen und gekeimten Sporen wieder. Darauf deuten die gemeinsamen langen Fluoreszenzlebensdauern des gebundenen NAD(P)H hin. Die

kürzeren Lebensdauern treten bei den gelagerten Sporen auf. Es könnte von einer Art Überlebensmetabolismus gesprochen werden. Eine Ausnahme bilden die WK-Sporen. Die zum Teil sehr großen Abweichungen lassen keine genaue Einordnung zu. Eine weitere Ausnahme bilden die abgetöteten Sporen. Entgegen der Erwartung ist nach der Sterilisation immer noch gebundenes NAD(P)H vorhanden. Die Lebensdauern liegen eher im Bereich der gelagerten Sporen, die Werte für die WK-Sporen lassen auch hier keine Aussage zu. Eine Aussage, wie aktiv die Sporen bzw. ihr aktueller Metabolismus ist, lässt sich durch die Analyse der Anteile der Fluoreszenz des enzymgebundenen NAD(P)H an der Gesamtfluoreszenz des NAD(P)H treffen.

4.1.4 Anteile der Fluoreszenz des enzymgebundenen NAD(P)H

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass sich bei dem Anteil des enzymgebundenen NAD(P)Hs immer nur auf die Gesamtfluoreszenz der NAD(P)H-Spezies bezogen wird und die Melaninfluoreszenz nicht weiter betrachtet wird. Tabelle 4.2 zeigt die Anteile der Amplituden sowie die Fluoreszenzanteile des freien und enzymgebundenen NAD(P)Hs. Die Anteile der Amplituden A_2 und A_3 geben bereits einen guten Hinweis auf die Aktivität der Spore. Anschaulichere Werte liefern die Fluoreszenzanteile F_2 und F_3 , welche qualitativ die NAD(P)H Konzentrationen beschreiben und in Abbildung 4.7 dargestellt sind. Generell deutet ein höherer Anteil an enzymgebundenen NAD(P)H auf mehr Aktivität hin. Einen deutlichen Beweis dafür stellen die Werte für die abgetöteten Sporen dar. In diesem Fall nehmen A_3 sowie F_3 die geringsten Werte an. Eine mögliche Erklärung ist die Destabilisierung der NAD(P)H bindenden Enzyme in Folge der drastischen Bedingungen der Sterilisation (Vgl. Kapitel 3; Sterilisierung für 30 Minuten bei 100 °C). Entgegen der Erwartung liegt aber dennoch ein Teil des NAD(P)Hs in gebundener Form vor. Auffallend sind die geringen Standardabweichungen, was auf eine gewisse Homogenität der Sporen hindeutet. Die Höchste Aktivität liegt bei den frisch geernteten und anschließend gekeimten Sporen vor. Dieser Effekt war zu erwarten, da der Metabolismus der Sporen durch die Keimung stark angeregt wird. Interessant sind die Daten für die gelagerten Sporen. Es wird deutlich, dass der Metabolismus während der Lagerung entgegen der Erwartungen und gängigen Modelle hoch aktiv ist. Einen Beweis dafür lieferten im Jahr 1963 bereits Vézina et al. Sie zeigten unter anderem, dass nicht-gekeimte und gelagerte Sporen von *Aspergillus Ochraceus* zur 11 α -Hydroxilierung von Progesteron benutzt werden können^[50]. Eine Folge

der Lagerung ist aber das verminderte Vermögen zur Keimung. Die Gründe dafür könnten der Verbrauch wichtiger Metabolitsubstanzen während der Lagerung oder eine interne Änderung der Enzymkonzentrationen sein. Einen Hinweis auf eine Veränderung des Enzymhaushalts geben bereits die Fluoreszenzlebensdauern, welche sich vom gelagerten zum gelagert gekeimten Zustand deutlich (> 500 ps) ändern. Es kommt also zu einer vermehrten Wechselwirkung zwischen den Proteinen und NAD(P)H während der Lagerung.

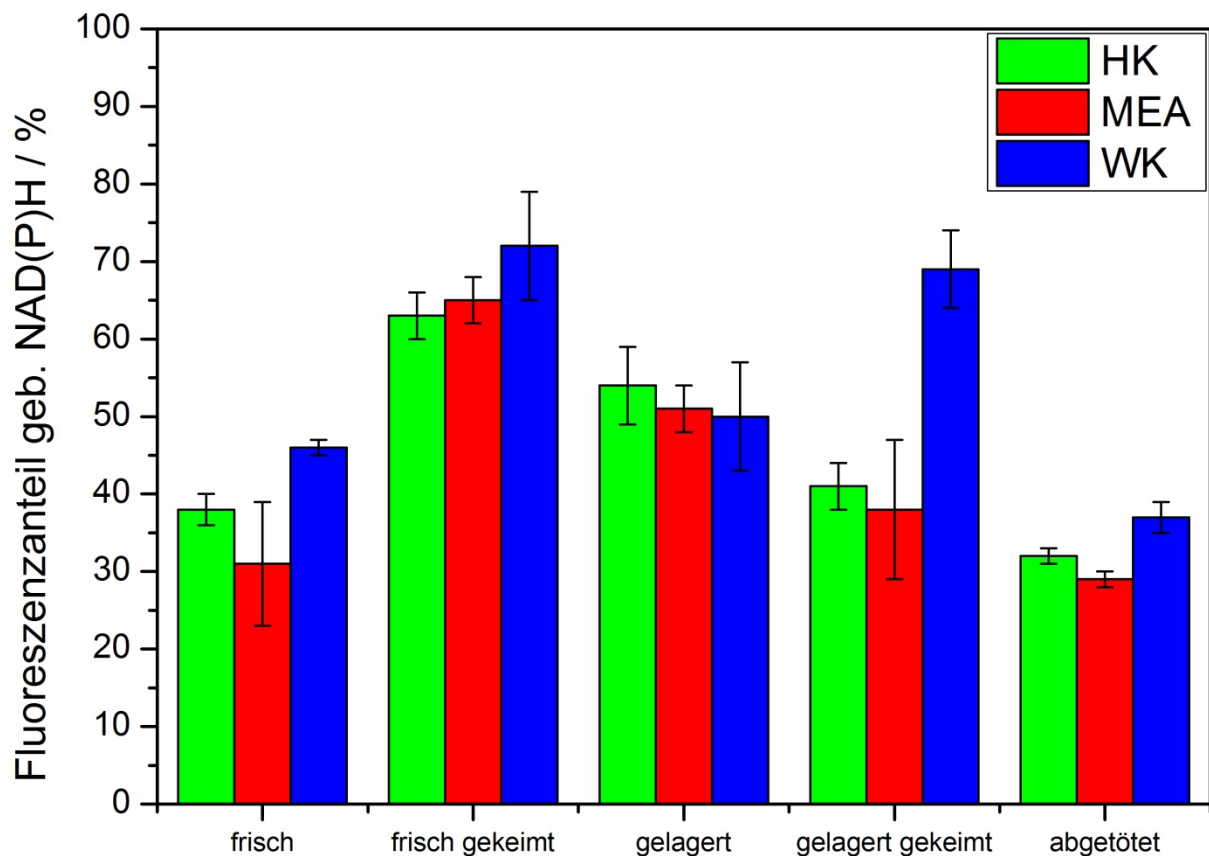


Abbildung 4.7: Anteil der Fluoreszenz des enzymgebundenen NAD(P)H (F_3) an der Gesamtfluoreszenz des NAD(P)H (F_2+F_3).

Nach wie vor wurden aber keine absoluten Konzentrationen bestimmt. Dies ist spektroskopisch möglich und sollte das Ziel zukünftiger Arbeiten sein. Werden frische Sporen als komplett intakt bewertet, so liegt zwar weniger NAD(P)H in gebundener Form als bei den gelagerten Sporen vor, jedoch wird das freie NAD(P)H nach der Anregung des Metabolismus zur Keimung sofort in den entsprechenden Funktionen eingespannt. Ausgehend davon könnten gelagerte Sporen als nicht vollständig intakt bezeichnet werden, zumindest wenn die Fähigkeit zur Keimung mit anschließender Ausbildung von Biomasse betrachtet wird. Die Ausnahme dieses Trends stellen die WK-Sporen dar. Sie besitzen nach der Lagerung nach wie vor eine gute Fähigkeit zur Keimung. Ein Grund dafür könnte in den ähnlichen Anteilen an gebundenem NAD(P)H bei den frischen und gelagerten Proben liegen. Im Gegensatz zu

den anderen beiden Spezies, bei denen eine deutliche Aktivierung des Metabolismus zu vermuten ist, bleibt dieser bei den WK-Sporen ungefähr auf einem Level. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die WK-Sporen generell über einen vermindert ausgeprägten Metabolismus verfügen. An dieser Stelle könnten absolute Konzentrationsmessungen helfen, um den Sachverhalt quantitativ zu klären, da in der vorliegenden Arbeit nur qualitative Aussagen über Anteile formuliert werden können.

4.1.5 Weitere FLIM-Messungen

Im Anschluss an die eigentlichen Messungen folgten einige vorbereitende FLIM-Messungen zum grundlegenden Verständnis des Keimungsprozesses von Pilzsporen. Dazu wurden die Sporen über weitere sechs Stunden dem Nährmedium zur Keimung ausgesetzt, wobei sich erste Hyphen und Keimschläuche entwickelten. Im Folgenden werden einige Ergebnisse dieser Messungen diskutiert, weitere Fluoreszenzlebensdauerbilder befinden sich im Anhang.

Abbildung 4.8 zeigt eine Spore mit ausgebildetem Keimschlauch. Auf allen Aufnahmen sind dunkle Flecken zu erkennen, an denen sich keine Fluorophore befinden, die bei der gewählten Anregungswellenlänge fluoreszieren bzw. eine Emission jenseits der durchlässigen Banden des Emissionsfilters besitzen (460 ± 80 nm). Das Melanin ist nach wie vor hauptsächlich in den Regionen der Zellwand lokalisiert. Die Intensität der Melaninfluoreszenz hat im Vergleich zu der Intensität der NAD(P)H-Fluoreszenz stark abgenommen, bezogen auf die oben beschriebenen Proben. Ein Grund dafür könnte die Aufweichung der Zellwand darstellen, welche nötig ist, um überhaupt einen Keimschlauch auszubilden. Infolgedessen könnte die Fähigkeit des Melanins zu fluoreszieren abnehmen und die Intensität verringert sich. Weitere Experimente mit gezielter Auflösung der Zellwand, durch den Einsatz von Chemikalien, könnten hier den Sachverhalt klären.

Interessant ist die Verteilung des freien und gebundenen NAD(P)H. Es findet keine gleichmäßige Verteilung über den Schlauch statt, sondern es gibt Regionen, in denen NAD(P)H eine höhere Konzentration besitzt. Im Bezug auf das gebundene NAD(P)H bedeutet das insbesondere, dass die Proteine, welche NAD(P)H binden, bevorzugt in diesen Regionen vorkommen. Das Ende des Keimschlauchs ist in Abbildung 4.8 nicht sichtbar, da er sich aus der Detektionsfläche heraus bewegt hat.

Zur Aufklärung des Keimprozesses sind weitere Messungen nötig. Es wäre denkbar einen lichtdurchlässigen Mikroreaktor zu verwenden, in dem die Wachstumsrichtung vorgegeben ist, da die Detektionsebene nur ein bis zwei Mikrometer hoch ist und während der Messungen nicht verändert werden kann. Außerdem könnte so eine Zeitrafferaufnahme über die gesamte Dauer der Keimung aufgenommen und ausgewertet werden. Es wäre dadurch möglich, die Bewegung des NAD(P)H sowie der Proteine, welche dieses binden, nachzuvollziehen.

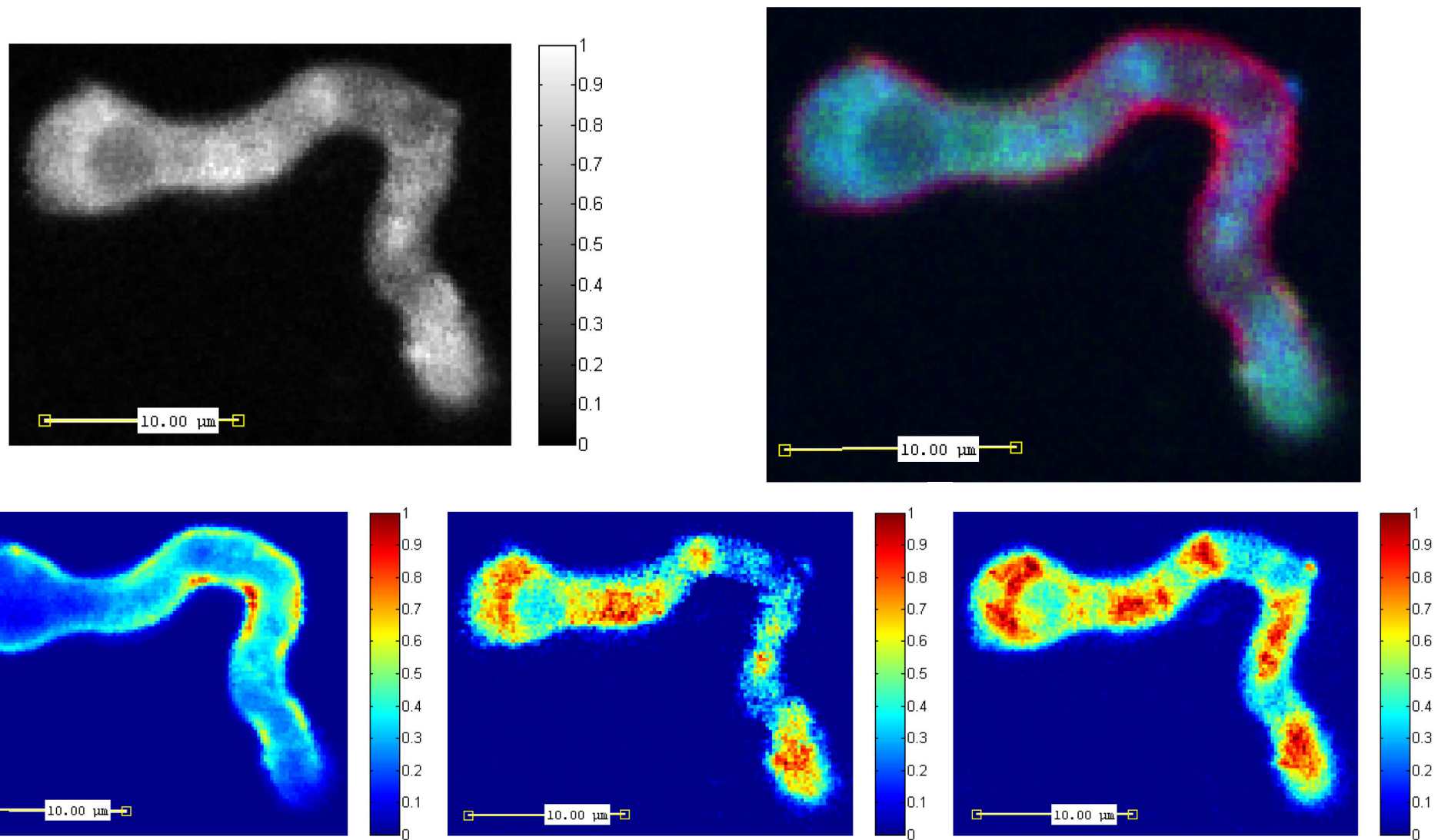


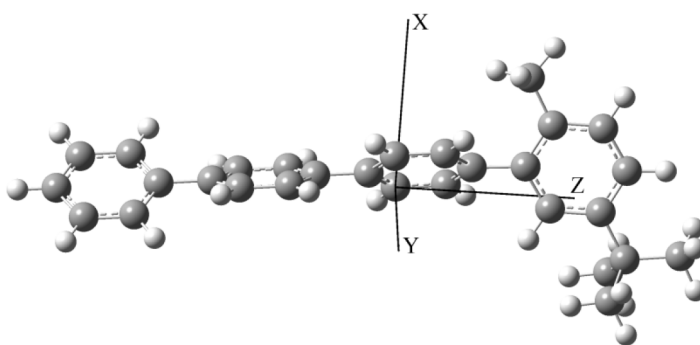
Abbildung 4.8: WK-Spore mit ausgebildetem Keimschlauch nach 12 Stunden der Keimung; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

4.2 Zweifarben-Zweiphotonen Messungen

Im Folgenden werden die Polarisationsmessungen vorgestellt. Zunächst werden die Ergebnisse der Messungen von 2-Methyl-5-*t*-butyl-*p*-quaterphenyl (DMQ) präsentiert. Anschließend werden die Messungen von Indol, Tryptophan und einigen Tryptophanderivaten diskutiert.

4.2.1 2-Methyl-5-*t*-butyl-*p*-quaterphenyl(DMQ)

Zunächst wurde das Farbstoffmolekül 2-Methyl-5-*t*-butyl-*p*-quaterphenyl untersucht, um den experimentellen Aufbau zu testen und die Theorie der M-Parameter zu verifizieren. DMQ ist ein Polyphenylfarbstoff, welcher als Laserfarbstoff in der Lasertechnik verwendet wird und weit verbreitet



in der chemischen sowie pharmazeutischen Industrie ist. Er hat sein Absorptionsmaximum im UV-Bereich

Abbildung 4.9: Kugelmodell des helikalen Konformers von 2-Methyl-5-*t*-butyl-*p*-quaterphenyl (DMQ); die schwarzen Kugeln stellen Kohlenstoffatome und die weißen Wasserstoffatome dar

und Quentmeier zeigte bereits, dass sich DMQ mit Hilfe eines Ti:Sa-Lasers bei einer effektiven Wellenlänge von 266 nm durch Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung mit 800 nm und 400 nm anregen lässt^[51]. Dabei ist die Intensität der Absorption gerade mal bei ungefähr der Hälfte der möglichen maximalen Absorption^[52]. Die resultierende Fluoreszenz ist aber auf Grund der hohen Quantenausbeute von DMQ intensiv genug, um sehr gute Signal-zu-Rausch-Verhältnisse zu erhalten.

Abbildung 4.10 zeigt die Fluoreszenzabklingkurve von DMQ, bei paralleler linear polarisierter Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung mit einer effektiven Wellenlänge von 266 nm. Die blaue Kurve stellt die Y-Komponente und die schwarze die X-Komponente im Bezug auf die Polarisation der Fluoreszenz dar. Die grüne und rote Linie entsprechen den Fitkurven nach den Gleichungen 3.4 und 3.5. Im unteren Teil der Abbildung 4.10 sind die Residuen für die entsprechenden Fitkurven gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fitkurven sehr gut mit den gemessenen Kurven übereinstimmen. Einzig im Bereich des Anstieges der

Fluoreszenz ist eine sehr geringe und vernachlässigbare Abweichung von unter einem Prozent erkennbar. Der Grund für diese Abweichung ist die Diskrepanz zwischen der gemessenen IRF und der Fluoreszenz. Die Apparatefunktion wird für einen sehr engen spektralen Bereich bestimmt, während die Fluoreszenz generell breiter aufgestellt ist. Desweiteren ist die IRF, für die im Experiment verwendeten Detektoren, stark abhängig von der Wellenlänge des detektierten Lichtes. Es ist also nicht verwunderlich, dass keine perfekte Übereinstimmung möglich ist. Die Diskrepanz des Untergrundes kommt durch die verschiedene Sensibilität der Detektoren oder ungleichmäßiges Justieren zustande und ist im akzeptablen Bereich. Der Unterschied wird während des Fittens durch den G-Faktor in den Gleichungen 3.4 und 3.5 berücksichtigt und ausgeglichen.

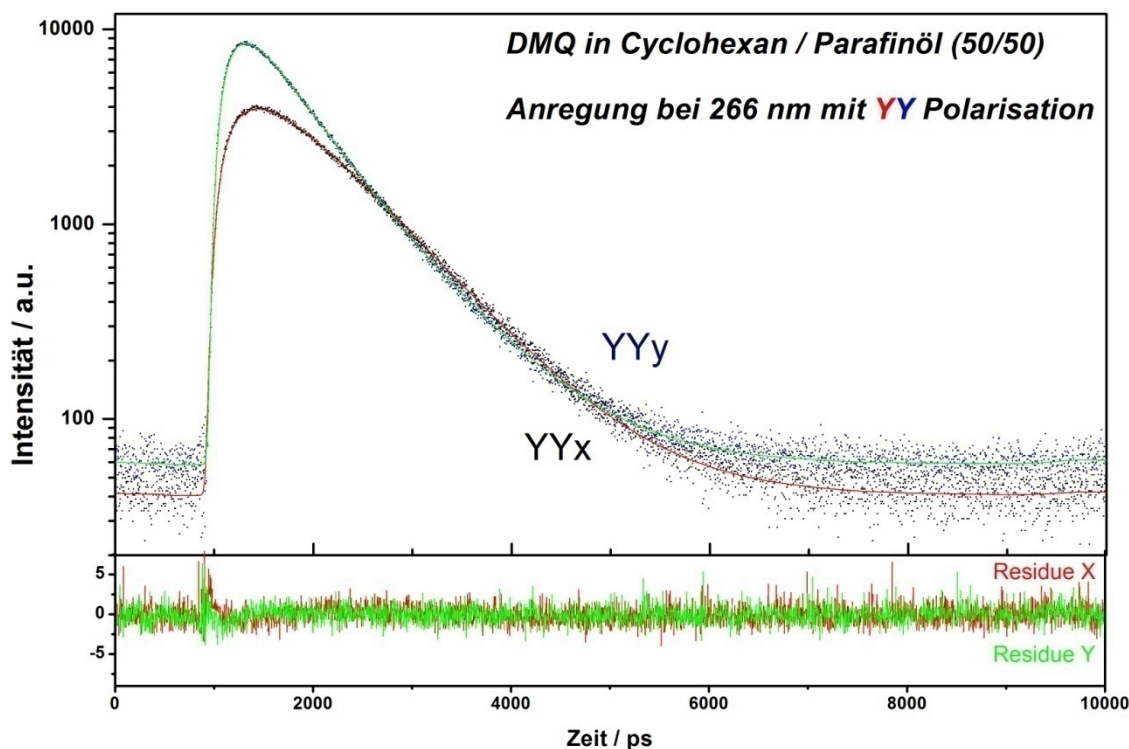


Abbildung 4.10: Zeitaufgelöstes Fluoreszenzsignal von DMQ gelöst in einer 50/50 Mischung von Parafinöl und Cyclohexan nach einer Zweifarben-Zweiphotonen-Anregung mit zwei linear parallel polarisierten Photonen bei einer effektiven Wellenlänge von 266 nm

In Abbildung 4.11 ist das komplette Polarisationsexperiment dargestellt. Es gibt für alle Polarisationskombinationen keine nennenswerten oder unerwarteten Abweichungen. Lediglich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Anregung mit gekreuzten linearen Photonen ist etwas kleiner, was aber durch die geringere totale Intensität zu erklären ist.

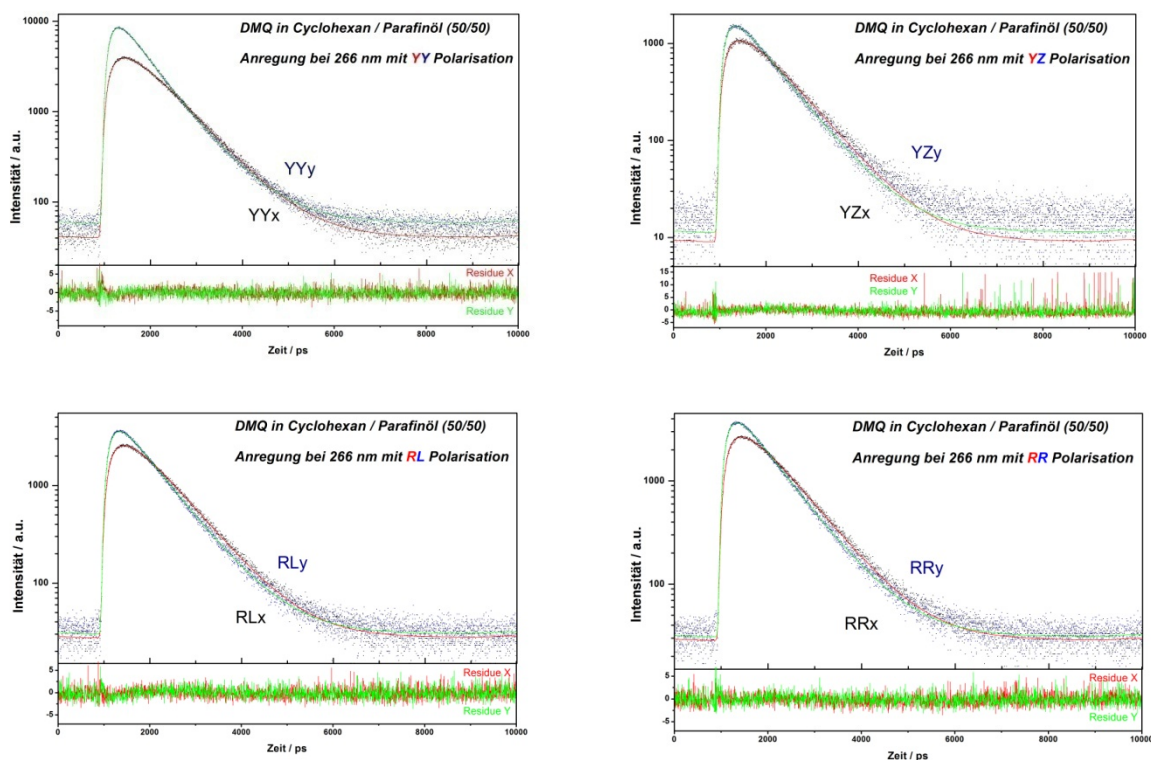


Abbildung 4.11: Übersicht über die DMQ-Fluoreszenz in Folge der Anregung mit allen relevanten Polarisationen.

Die Ergebnisse der Analyse der Fluoreszenzdaten für DMQ nach den Gleichungen 3.4 bis 3.11 befinden sich in Tabelle 4.3. Die Fluoreszenzlebensdauer für DMQ beträgt 753 ps und stimmt innerhalb der Fehlergrenzen sehr genau mit der Literatur überein ($742 \text{ ps} \pm 6 \text{ ps}$)^[51].

Die Rotationskorrelationszeit besitzt einen Wert von 725 ps. Für diesen Wert konnte zum

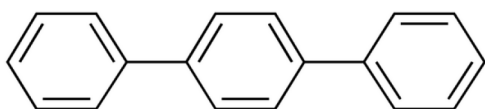


Abbildung 4.12: p-Terphenyl (PTP).

Zeitpunkt des Entstehens dieser Arbeit kein Literaturwert gefunden werden. Ein Vergleich mit dem, dem DMQ sehr ähnlichen Molekül, *p*-Terphenyl (PTP) ist naheliegend und gibt einen guten Anhaltspunkt. So besitzt eine PTP-

Cyclohexan/Parafinöl-Lösung eine Rotationskorrelationszeit von 252 ps^[7]. Der in dieser Arbeit vorgestellte Wert von 725 ps für das DMQ-Molekül ist insoweit als realistisch anzunehmen, als dass DMQ das größere Molekül im Vergleich zu PTP ist und somit eine deutlich gehinderte Rotation aufweisen muss.

Tabelle 4.3: Fluoreszenzdaten von DMQ in einer 50/50 Mischung aus Cyclohexan und Parafinöl. Die Fehlerwerte ergeben sich als Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

Anregungs- geometrie	Anisotropie r_0	Totale Intensität I (normiert)	Fluoreszenzlebens- dauer τ_F (ps)	Rotationskorrelations- zeit τ_r (ps)
YY	$0,51 \pm 0,004$	$1 \pm 0,09$	753 ± 6	725 ± 45
RR	$-0,24 \pm 0,005$	$0,63 \pm 0,01$		
RL	$-0,24 \pm 0,004$	$0,63 \pm 0,02$		
YZx	$-0,49 \pm 0,014$	$0,25 \pm 0,01$		
YZy	$0,28 \pm 0,006$	$0,25 \pm 0,01$		

Die Anisotropie liegt mit einem Wert von 0,51 sehr hoch und deutet so auf einen symmetrischen Übergang hin. Einen weiteren Hinweis auf einen symmetrischen Übergang gibt die Verteilung der Intensitäten in Tabelle 4.3 preis. Anhand der Form des DMQ-Moleküls mit seiner sehr langen Hauptachse, ist dies zu erwarten. Quantitative Aussagen können aufgrund dieser Überlegungen jedoch nicht getroffen werden und von daher es ist notwendig, die molekularen Parameter zu bestimmen, um die Dynamik des Zweifarben Zweiphotonenübergangs detailliert beschreiben zu können.

Bevor die Analyse der M-Parameter durchgeführt wird, ist es sinnvoll die Übergangsdipolmomente und Symmetrien der angeregten Zustände von DMQ zu diskutieren. Aus diesem Grund sind in Abbildung 4.13 die Ergebnisse der theoretischen Berechnungen^[53] der möglichen Konformere des Grundzustands des p-Quarterphenyls dargestellt. Es gibt drei verschiedene Konformere, die miteinander im Gleichgewicht stehen: ein Helikales und ein Kettenförmiges, welche D_2 -Symmetrie besitzen und ein Verdrilltes mit C_2 -Symmetrie. Die Torsionswinkel χ zwischen den Phenylringen betragen bei allen dieser Konformere rund 33° . Wie durch weitere theoretische Berechnungen^[53] gezeigt, ändert sich durch die Erweiterung einer der beiden endständigen Phenylringe, durch eine Methylgruppe und eine tertiäre Butylgruppe, lediglich der Torsionswinkel an dem substituierten Ring auf 51° , was aufgrund des sterischen Anspruchs der Substituenten zu erwarten ist. Die Berechnungen für den ersten angeregten Zustand von DMQ ergeben Werte von $\chi \simeq 0,6^\circ, -1,4^\circ$ und 34° . Demzufolge ist die Geometrie des ersten angeregten Zustands als nahezu planar anzunehmen.

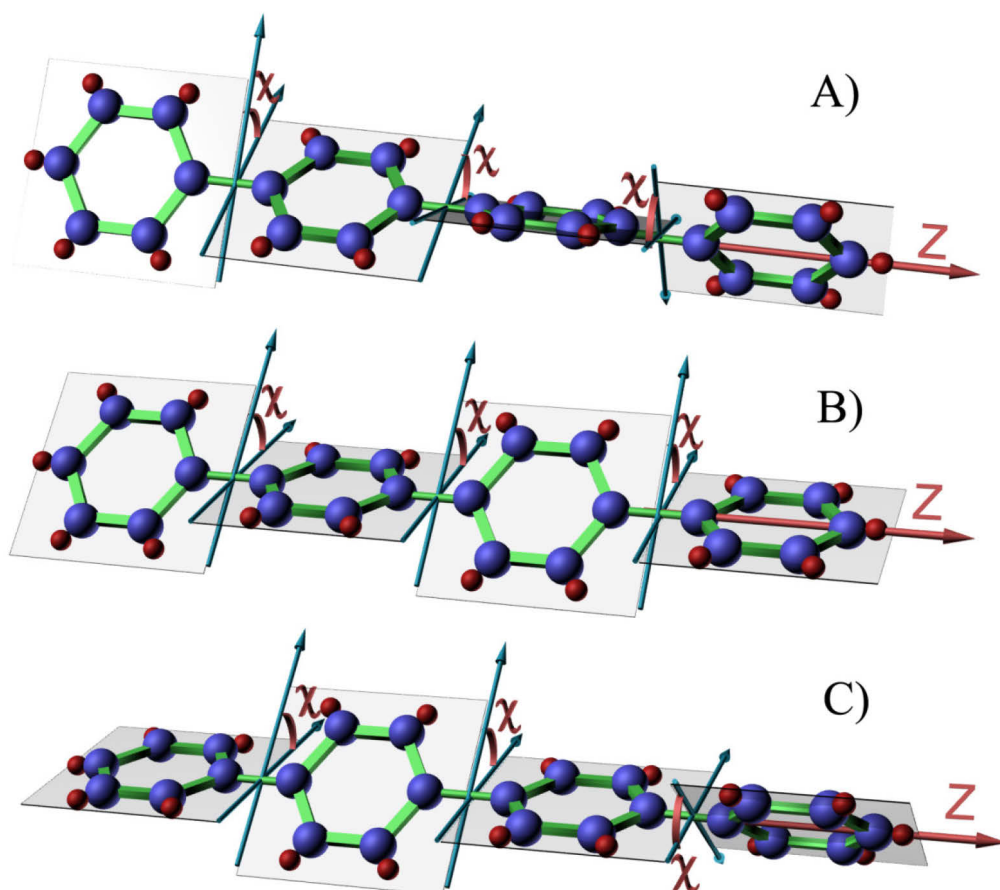


Abbildung 4.13^[53]: Die drei Konformere des p-Quarterphenyls: A) helikales Konformer D_2 -Symmetrie; B) kettenförmiges Konformer D_2 -Symmetrie; C) verdrilltes Konformer C_2 -Symmetrie; χ ist dabei jeweils der Winkel zwischen zwei Ringebenen.

Die simulierten Anregungsenergien und Übergangsdipolmomente für die ersten drei Übergänge der p-Quarterphenylkonformere sind in Tabelle 4.4 gezeigt. Es ist leicht zu erkennen, dass die Übergangsenergien für das helikale und das kettenförmige Konformer ähnliche Werte aufweisen. Für die Anregung des verdrillten Konformer werden dahingegen höhere Energien benötigt. Desweiteren weisen die Werte der Übergangsdipolmomente auf einen bevorzugten Übergang parallel zu der Hauptmolekülachse Z hin.

Ein Vergleich der Tabellen 4.4 und 4.5 zeigt den Einfluss der Substituenten des DMQs. Durch die sterisch anspruchsvollen Substituenten des DMQs geht die Symmetrie des ersten angeregten Zustands zwar verloren, aber die Energie sinkt gerade mal um 0,12 eV. Ein viel schwerwiegenderer Effekt ist die Absenkung der höheren Energieniveaus. So liegen beim p-Quarterphenyl gerade einmal drei angeregte Zustände bis zu einer Grenze von 5,2 eV vor, während es beim DMQ bereits neun sind. Daraus folgt, dass die Substitution die energetische Struktur des DMQs deutlich verdichtet.

Tabelle 4.4^[53]: Ergebnisse der Berechnungen der Energien der ersten drei angeregten Zustände sowie der Übergangsdipolmomente für die drei Konformere des p-Quartenphenyls. Die Z-Achse entspricht der Molekülhauptachse.

Geometrie des Konformers	Symmetrie des angeregten Zustands	Energie des Übergangs (eV)	Übergangsdipolmoment (a.u.)		
			X	Y	Z
Helikal	B1	4,1425	0,0000	0,0000	-3,1065
	B2	4,8115	0,0000	0,1031	0,0000
	B2	5,1339	0,0000	0,0577	0,0000
Kettenförmig	B1	4,1338	0,0000	0,0000	3,0852
	B2	4,7868	0,0000	0,0637	0,0000
	B2	5,1298	0,0000	0,0768	0,0000
Verdrillt	A	4,1769	0,0000	0,0000	2,8712
	A	5,3509	0,0000	0,0000	-0,0186
	A	6,2250	0,0000	0,0000	-0,6152

Tabelle 4.5^[53]: Ergebnisse der Berechnungen der Anregungsenergien und Übergangsdipolmomente für DMQ im Vakuum infolge einer optischen Anregung aus dem Grundzustand des helikalen Konformers.

Angeregter Zustand	Energie des Übergangs (eV)	Übergangsdipolmoment (a.u.)		
		X	Y	Z
1	4,02	0,3524	-0,0131	3,6729
2	4,50	-0,1176	0,0070	0,5959
3	4,54	0,0532	0,0049	-0,1780
4	4,68	-0,0003	0,0011	-0,2832
5	4,71	0,1441	-0,0103	0,3226
6	4,79	0,0010	0,0210	-0,0094
7	4,93	0,0835	-0,0043	-0,0592
8	5,05	-0,2230	-0,0390	0,2342
9	5,17	-0,0802	0,1207	0,0255
10	5,25	-0,3383	0,0565	-0,0172

Tabelle 4.6^[53]: Ergebnisse der Berechnungen der Anregungsenergien und Übergangsdipolmomente für DMQ gelöst in einer Cyclohexan/Parafinöl-Mischung. Die Z-Achse ist entlang der langen Molekülachse ausgerichtet. Die X-Achse ist entlang der rechten endständigen Ringebene ausgerichtet.

Geometrie des angeregten Zustands	Angeregter Zustand	Energie des Übergangs (eV)	Übergangsdipolmoment (a.u.)		
			X	Y	Z
nicht relaxiert	1	3,58	0,40	-0,019	3,97
	2	4,12	-0,1566	0,0064	0,5613
	3	4,18	0,0530	0,0068	-0,12
	4	4,32	0,0386	0,0024	0,2835
	5	4,36	0,1685	-0,0168	0,2432
	6	4,44	-0,0005	0,0433	-0,0070
	7	4,53	0,0979	-0,0039	-0,1806
	8	4,70	-0,2614	-0,0514	0,2647
	9	4,80	-0,0666	0,1275	0,0337
	10	4,88	-0,4194	0,0858	-0,0150
relaxiert	1	3,173	0,438	-0,0732	4,587
	2	3,881	-0,1058	0,0145	0,783
	3	3,985	0,0551	0,0132	0,0323

Bisher bezogen sich alle Betrachtungen bzw. Berechnungen auf Moleküle im Vakuum. Tabelle 4.6 zeigt die Ergebnisse der Berechnungen für DMQ in einer Cyclohexan/Parafinöllösung. Es ist zu erkennen, dass die Übergangsenergien, im Bezug auf die Ergebnisse im Vakuum, durch die Solvensmoleküle noch weiter verringert werden. Auch die energetische Struktur wird weiter verdichtet, wenn auch nicht so stark wie im vorangegangenen Fall. Es sei angemerkt, dass die Anregungsenergie im Experiment 4,649 eV betragen hat, was in etwa dem siebenten angeregtem Zustand von DMQ entspricht. Desweiteren deutet Tabelle 4.6 daraufhin, dass das Übergangsdipolmoment des ersten angeregten Zustands parallel zur Z-Achse verläuft, welche der langen Molekülachse des DMQs entspricht.

Die Ergebnisse der Analyse der Messdaten von DMQ anhand von Gleichung 2.16 sind in der zweiten Spalte von Tabelle 4.7 aufgelistet. Die resultierenden $M_{K\epsilon}(R,R')$ -Parameter sind auf den isotropen Wert $M_0(0,0)$ normiert. Auffällig sind zum Einen die dominierenden Werte von $M_0(0,0)$, $M_0(2,2)$, $M_2(0,2)$ und $M_2(2,2)$ und zum Anderen die, im Vergleich zu den eigentlichen Werten, großen Standardabweichungen für die restlichen Parameter. Der Wert

$M_0(1,1)$ ist ein isotroper Wert und muss laut der Theorie einen Wert größer Null annehmen. Durch Berücksichtigung der Standardabweichung ist dies auch gegeben. Alles in Allem lässt sich hier klar erkennen, dass die nicht dominierenden Werte mit dem Index $R=1$ durch Einbeziehung der Standardabweichungen auf Werte nahe Null hinweisen. Es ist sinnvoll, bei der derzeitigen experimentellen Genauigkeit, die Parameter mit dem Index $R=1$ gleich Null zu setzen und mit Hilfe eines SVD-Fits (Single Value Decomposition Fit) die restlichen Parameter zu bestimmen. Die Ergebnisse des SVD-Fits sind in der dritten Spalte von Tabelle 4.7 aufgeführt. Es ist leicht zu erkennen, dass die Abweichungen nur marginal sind und die generellen Beziehungen der Parameter zueinander gleich bleiben. Daraus folgt, dass die Approximation $M_0(1,1) = M_2(1,1) = M_2(1,2) = 0$ durchaus angebracht ist. Laut Tabelle 2.2 deuten diese Werte für die M-Parameter für D_{2h} -Symmetrie auf einen totalsymmetrischen Übergang $A_g \leftarrow A_g$ hin.

Tabelle 4.7: M-Parameter für DMQ, gelöst in einer 50/50 Cyclohexan/Mineralöl-Mischung; Alle Werte wurden auf den Parameter $M_0(0,0)$ normiert.

$M_{ke}(R,R')$	Globaler Fit über alle sieben Parameter	SVD-Fit für vier Parameter
M0(0,0)	1	1
M0(1,1)	-0.13 ± 0.17	0
M0(2,2)	0.79 ± 0.03	0.82 ± 0.03
M2(1,1)	0.25 ± 0.16	0
M2(0,2)	1.73 ± 0.1	1.79 ± 0.1
M2(1,2)	-0.08 ± 0.5	0
M2(2,2)	1.16 ± 0.2	1.24 ± 0.22

Weiter Informationen lassen sich aus der Analyse der sphärischen Komponenten des Zweiphotonentensors erhalten, welche laut Vasyutinskii^[6]:

$$S_{R\gamma} = \sum_{q_1 q_2 n_i} C_{1q_1 1q_2}^{R\gamma} \left\langle n_e \left| \hat{d}_{q_2} \right| n_i \right\rangle \left\langle n_i \left| \hat{d}_{q_1} \right| n_g \right\rangle \times \left(\frac{1}{E_i - E_g - \hbar\omega_1} + \frac{(-1)^R}{E_i - E_g - \hbar\omega_2} \right) \quad (4.4)$$

sind. Dabei sind die Terme in den eckigen Klammern die Übergangsdipolmomente für die beiden Photonen. Die Terme in den runden Klammern stehen für die Vertauschung der beiden Photonen, so dass alle möglichen Fälle berücksichtigt sind. Sollten zwei gleiche Photonen verwendet werden, wird der gesamte Term für $S_{R\gamma}$ mit $R=1$ gleich Null. Die Indizes i, g, und e

stehen für intermediären-, den Grund- und den angeregten Zustand. Summiert wird über die sphärischen Indizes $q_1, q_2 = -1, 0, 1$ und die Quantenzahl aller intermediären Zustände n_i . Der Vollständigkeit halber sei hier noch die Beschreibung des Fluoreszenztensors angeführt:

$$F_{1q} = \left\langle n_f \left| \hat{d}_{qf} \right| \tilde{n}_e \right\rangle \quad (4.5)$$

mit den Indizes f für den Endzustand und e für den untersten angeregten Zustand. Der Index q_f kann auch hier die Werte -1, 0 und 1 annehmen. Die Berechnung der sphärischen Komponenten des Zweiphotonentensors aus den M-Parametern kann recht komplexe Züge annehmen, falls das Übergangsdipolmoment der Fluoreszenz Beiträge aller drei Raumrichtungen aufweist. An dieser Stelle sei noch einmal auf Gleichung 2.17 verwiesen. Für das DMQ-Molekül ist das jedoch nicht der Fall. Die erste Zeile von Tabelle 4.5 zeigt, dass der Übergang hauptsächlich parallel zur Z-Achse stattfindet und die restlichen Beiträge vernachlässigbar sind. Durch Vereinfachung von Gleichung 2.17 ergeben sich daraus folgende Gleichungen zur Bestimmung der sphärischen Komponenten des Zweiphotonentensors, wobei der Term $|F_z|^2$ der Einfachheit halber vereinheitlicht wurde:

$$\begin{aligned} M_0(0,0) &= |S_{00}|^2 \\ M_0(2,2) &= \frac{1}{\sqrt{5}} \left(|S_{20}|^2 + 2|S_{21}|^2 + 2|S_{22}|^2 \right) \\ M_2(0,2) &= -\sqrt{2} S_{00} S_{20} \\ M_2(2,2) &= \frac{2}{\sqrt{7}} \left(|S_{20}|^2 + |S_{21}|^2 - 2|S_{22}|^2 \right) \\ M_0(1,1) &= M_2(1,1) = M_2(1,2) = 0 \end{aligned} \quad (4.6-4.10)$$

Die Beziehung zwischen den sphärischen und kartesischen Komponenten ist:

$$\begin{aligned} S_{00} &= -\frac{1}{\sqrt{3}} \text{Tr} \mathbf{S} = -\frac{1}{\sqrt{3}} (S_{xx} + S_{yy} + S_{zz}) \\ S_{20} &= \frac{1}{\sqrt{6}} (2S_{zz} - S_{xx} - S_{yy}) \\ S_{22}^2 &= \frac{1}{4} (S_{xx} - S_{yy})^2 \\ |S_{21}|^2 &= S_{xz}^2 + S_{yz}^2 \end{aligned} \quad (4.11-4.14)$$

Aus den Gleichungen 4.6 bis 4.14 lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: Das Element S_{00} ist proportional zur Spur des Zweiphotonentensors \mathbf{S} . Das Element S_{20} ist die

Quadrupel Komponente des Tensors S , welche die Ausrichtung des Tensors S entlang der molekularen Z -Achse beschreibt. Das Element S_{22} beschreibt die Asymmetrie der Zweiphotonenanregung in der XY -Ebene des Moleküls. Da S_{22} komplexe Werte annehmen kann, beschreibt seine Phase die Rotation der XY -Ebene. Leider ist es im Rahmen der verwendeten Theorie nicht möglich die Phase von S_{22} zu bestimmen. Das letzte Element des Tensors ist S_{21} und beschreibt die Neigung der Hauptachse des Tensors bezüglich der Z -Achse. Die Ergebnisse der Berechnungen des Zweiphotonentensors sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

Tabelle 4.8: Zweiphotonentensor S für die 2C2P Anregung von DMQ gelöst in Cyclohexan/Parafin

Tensorelement	Wert
S_{00}	$1 \pm 0,2$
S_{20}	$-1,27 \pm 0,2$
$ S_{21} $	$0,29 \pm 0,07$
$ S_{22} $	$0,17 \pm 0,05$

Anhand von Gleichung 4.11 und 4.12 kann nun der Term $\frac{S_{zz}}{TrS} \approx 0.93$ berechnet werden.

Damit sind alle vorangegangenen Vermutungen bestätigt und die Zweiphotonenanregung findet hauptsächlich (93 %) durch die $dzdz$ -Komponenten des Übergangsdipolmomentes statt, während die anderen Komponenten wie $dxdx$ und $dydy$ nur kleine, vernachlässigbare Anteile an dem Übergang haben. Der kleine Wert von S_{22} unterstützt dieses Argument und deutet darauf hin, dass der Zweiphotonentensor axial symmetrisch zur Z -Achse des Moleküls ist. Dennoch gibt S_{21} einen Wert, der selbst bei Berücksichtigung der Statistik nicht nahe Null ist. Dies deutet auf einen Übergang anderer Symmetrie und zwar bezüglich der $dxdz$ - und $dydz$ -Komponenten des Übergangsdipolmomentes hin. Da weder S_{21} noch S_{00} verschwinden, wurde vermutlich eine Mischung von Zuständen verschiedener Symmetrien, unter den experimentellen Voraussetzungen dieser Arbeit, angeregt.

Für weitere Messungen an DMQ wurde Hexan als Lösungsmittel verwendet, um den Einfluss der Viskosität auf die Anisotropie zu zeigen. In Abbildung 4.14 sind die Intensitätskurven für die DMQ in Hexan mit allen nötigen Anregungspolarisationen dargestellt. Auffällig ist, dass die Residuen in Abbildung 4.14 leichte Trends bzw. Abweichungen aufzeigen. Die Abweichungen sollten jedoch nicht überbewertet werden, handelt es sich mit einer

Abweichung von maximal 5 counts auf einen Intensitätswert von über 10000 counts (0,05 %) eher um ein vernachlässigbares Problem. Abhilfe könnte eine genauere Messung der IRF des zweiten APD-Paares schaffen, da dieses für die Messungen von DMQ in Hexan verwendet wurde und der Grund der Abweichungen darin vermutet wird.

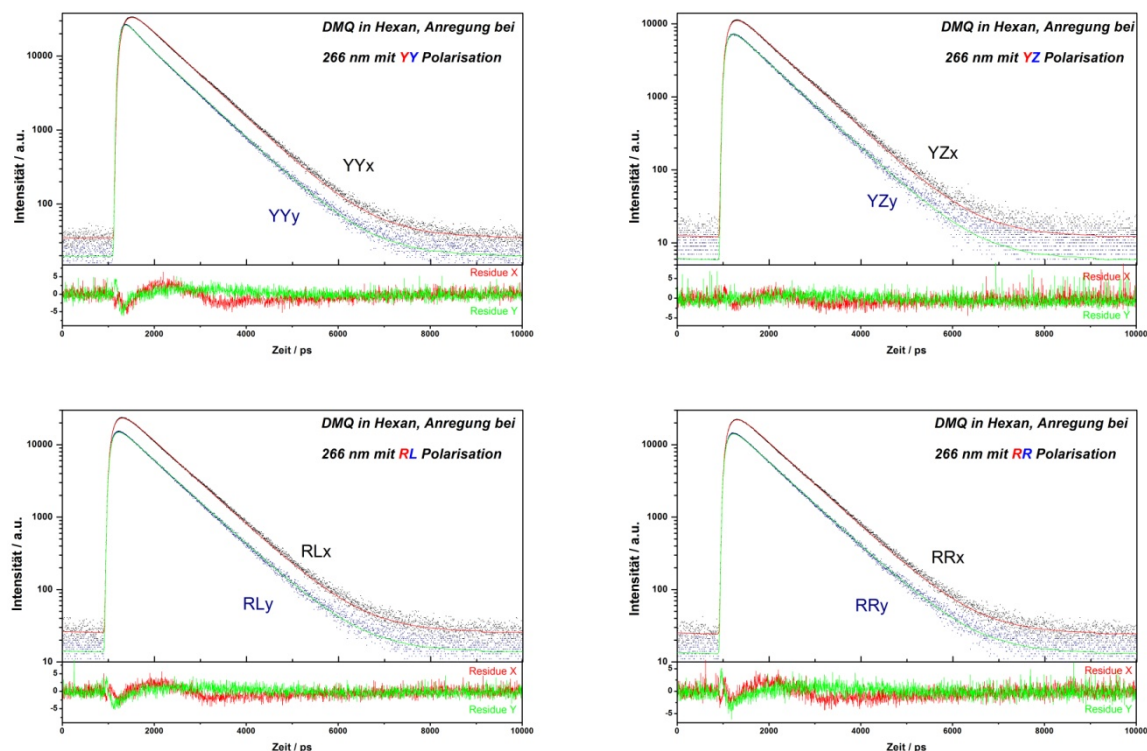


Abbildung 4.14: Übersicht über die DMQ-Fluoreszenz einer DMQ-Hexan-Lösung in Folge der Anregung mit allen relevanten Polarisationen.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Auswertung der Fluoreszenzdaten einer DMQ-Hexan-Lösung. Die Fehlerwerte ergeben sich als Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

Anregungs- geometrie	Anisotropie r_0	Totale Intensität I (normiert)	Fluoreszenzlebens- dauer τ_F (ps)	Rotationskorrelations- zeit τ_r (ps)
YY	$0,41 \pm 0,003$	$1 \pm 0,03$	747 ± 1	126 ± 3
RR	$-0,19 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,07$		
RL	$-0,19 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,02$		
YZx	$-0,36 \pm 0,004$	$0,33 \pm 0,02$		
YZy	$0,27 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,02$		

In Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse der Analyse der Fluoreszenzdaten für eine DMQ-Hexan-Lösung nach den Gleichungen 3.4 bis 3.11 dargestellt. Wie zu erwarten, nimmt die Anisotropie der Lösung durch Verwendung eines nur leicht viskosen Lösungsmittels ab.

Gleichzeitig wird die Rotationskorrelationszeit kürzer. Die Moleküle rotieren jetzt viel schneller und das gesamte System verliert an Trägheit. Das DMQ-Molekül ist jedoch so groß, dass es nach wie vor einen relativ hohen Wert für die Anisotropie aufweist. Die Fluoreszenzlebensdauer bleibt im Rahmen der Statistik gleich und bestätigt den Wert der vorangegangenen Messungen in Cyclohexan/Paraffin. Dies war zu erwarten und eine Abweichung würde auf eine Interaktion mit dem Lösungsmittel oder auf Verunreinigungen hinweisen.

Tabelle 4.10: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Fits zur Ermittlung der molekularen Parameter für DMQ gelöst in Cyclohexan/Paraffin und Hexan. Alle Werte wurden auf den jeweiligen von Wert $M_0(0,0)$ normiert.

	DMQ in Cyclohexan/Paraffin		DMQ in Hexan	
$M_{ke}(R,R')$	Globaler Fit über alle sieben Parameter	SVD-Fit für vier Parameter	Globaler Fit über alle sieben Parameter	SVD-Fit für vier Parameter
$M_0(0,0)$	1	1	1	1
$M_0(1,1)$	$-0,13 \pm 0,17$	0	$-0,10 \pm 0,11$	0
$M_0(2,2)$	$0,79 \pm 0,03$	$0,82 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,07$
$M_2(1,1)$	$0,25 \pm 0,16$	0	$0,28 \pm 0,20$	0
$M_2(0,2)$	$1,73 \pm 0,1$	$1,79 \pm 0,1$	$1,48 \pm 0,07$	$1,50 \pm 0,13$
$M_2(1,2)$	$-0,08 \pm 0,5$	0	$-0,28 \pm 0,24$	0
$M_2(2,2)$	$1,16 \pm 0,2$	$1,24 \pm 0,22$	$1,08 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,13$

Die Ergebnisse der Berechnungen der M-Parameter für DMQ gelöst in Hexan sind in Tabelle 4.10 mit den Ergebnissen für DMQ gelöst in Cyclohexan/Paraffin gegenübergestellt. Auch für DMQ in Hexan macht ein SVD-Fit für vier Parameter Sinn, da die M-Parameter mit dem Index $R=1$ große statistische Fehler bezogen auf den eigentlichen Wert und dadurch Werte nahe Null aufweisen. Insgesamt deuten die Werte für DMQ in Hexan laut Tabelle 2.5 ebenfalls auf einen totalsymmetrischen Übergang $A_g \leftarrow A_g$ hin. Interessant ist die Veränderung der Parameter $M_0(2,2)$ und $M_2(0,2)$, welche nicht durch statistische Schwankungen erklärt werden kann. Dieser Effekt muss also auf die Veränderung der Umgebung des DMQs zurückzuführen sein.

Eine konkrete Aussage lässt sich durch die Analyse des Zweiphotonentensors ermöglichen, welcher in Tabelle 4.11 aufgeführt ist. Es ist leicht zu erkennen, dass der Wert für S_{21}

dominanter wird und der Wert für S_{20} an Einfluss verliert. Dadurch findet eine Verschiebung der Anregung in die $dxdz$ - und $dydz$ -Komponenten des Übergangsdipolmomentes statt. Untermauert wird dies durch $\frac{S_{zz}}{TrS} \approx 0.83$. Der Übergang findet aber nach wie vor hauptsächlich entlang der Z-Achse statt.

Tabelle 4.11: Zweiphotonentensor S für die 2C2P Anregung von DMQ gelöst in Cyclohexan/Paraffin und Hexan

Tensorelement	DMQ in Cyclohexan/Paraffin	DMQ in Hexan
S_{00}	$1 \pm 0,2$	$1 \pm 0,2$
S_{20}	$-1,27 \pm 0,2$	$-1,06 \pm 0,3$
$ S_{21} $	$0,29 \pm 0,07$	$0,73 \pm 0,06$
$ S_{22} $	$0,17 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,06$

4.2.2 Indol

Indol ist ein in der Spektroskopie wichtiges und häufig untersuchtes biologisches Molekül, welches die Fähigkeit zu fluoreszieren besitzt. Es bildet die kleine chromophore Grundeinheit des Tryptophans und ermöglicht dadurch die spektroskopische Untersuchung dieser Aminosäure sowie der Eiweiße in denen sie vorkommt auf natürliche Art und Weise ohne den zusätzlichen Einsatz von künstlichen Farbstoffen. Bereits in den 1960er Jahren wurde das Polarisationspektrum von Indol von Weber et. al. aufgenommen^[54]. Sie erkannten, dass das Minimum im Polarisationspektrum bei 290 nm und dessen gleichzeitiger Anstieg im Absorptionsspektrum nur durch das Vorhandensein von zwei unabhängigen und sehr nah bei einander liegenden elektronischen Übergängen zu erklären sei. In Anlehnung an die Arbeiten von Platt zu den Spektren von aromatischen Kohlenwasserstoffen aus dem Jahr 1949, ordneten sie diese beiden Übergänge den L_a und L_b Zuständen zu^[55]. Der L_a Zustand kann als diffuses energetisches Band beschrieben werden, welches in unpolaren Lösungsmitteln über dem energetisch scharfen L_b Zustand liegt. Dieses Verhalten ändert sich in polaren Lösungsmitteln, wo der L_a Zustand unter dem L_b Zustand liegt^[56]. Anderson et. al. führten die ersten Zweiphotonenexperimente an Indol in Hexan durch und zeigten, dass der L_a Zustand deutlich schwächer zur Absorption beiträgt, wenn zwei Photonen statt einem zur Anregung verwendet werden. Desweiteren berichteten sie von einem starken Anstieg des Polarisationsgrades, wenn am roten Ende des Absorptionsspektrums angeregt wird^[57].

Erklären lässt sich dieses Verhalten durch die ausschließliche Anregung des L_b Zustands. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Orientierung der beiden Zustände. Es ist bereits bekannt, dass die Übergangsdipolmomente von L_a und L_b senkrecht zueinander in der xy-Ebene, bezogen auf die Molekularkoordinaten, des Indols liegen^[58, 59].

Sämtliche bisher erwähnte Messungen an Indol boten lediglich die Möglichkeit qualitative Aussagen über die Anisotropie von Indol zu treffen. Desweiteren gibt es keine zeitaufgelösten Messungen mit ultrakurzen Pulsen zur Anisotropie des Indols. Die bislang erfolgreichsten Anisotropiemessungen wurden von Lakowicz et. al. durchgeführt, jedoch benutzten sie Techniken der Frequenz-Domäne, welche nur zur Bestimmung von mittleren Anisotropien führen^[60]. Dadurch konnten bereits guten Tendenzen ermittelt werden, aber eine genaue quantitative Bestimmung von r_0 blieb aus. Die Messungen in der vorliegenden Arbeit beschränken sich ausschließlich auf Messungen der Zeit-Domäne. Dadurch ist es möglich durch Extrapolierung die Anisotropie zum Zeitpunkt t_0 tatsächlich genau zu bestimmen. Gryczynski et. al. hatten 1996 bereits die Idee einen Ti:Sa-Laser zu benutzen, um eine Zweiphotonen-Zweifarb-Anregung zu realisieren und Indol als auch Tryptophan damit zu untersuchen^[61]. Ihr Vorhaben wurde teilweise von Qiao et. al. im Jahr 2009 realisiert, aber die 2C2P-Anregung gelang nur teilweise. Die Fluoreszenzintensität wurde stark durch den Hintergrund der Drei- und Zweiphotonenanregung beeinflusst (ca. 17 % Dreiphotonenanregung, 50 % Zweiphotonenanregung)^[62]. Die ursprüngliche Idee, einen Femtosekundenlaser zur 2C2P-Anregung zu nutzen, wurde in dieser Arbeit erneut aufgegriffen und verwirklicht. Zum ersten Mal wurden quantitative Polarisationsmessungen an Indol mit einem Femtosekundenlaser realisiert. Mit Hilfe der M-Parameter-Theorie wurde so das vorhandene Spektrum an Polarisationsmessungen erweitert und Indizien zur Aufklärung der Interaktion zwischen dem L_a und L_b Zustand geschaffen.

Abbildungen 4.15 bis 4.18 zeigen Beispiele für die gesammelten Fluoreszenzdaten und die dazugehörigen Fits sowie Residuen. Die Abweichungen in den Residuen sind vor allem am Anfang der Steigung der Kurve am größten. Dabei übersteigen sie aber nur selten einen Wert von einem Prozent. Der Grund für diese Abweichung ist die Diskrepanz zwischen der gemessenen IRF und der Fluoreszenz. Die Apparatefunktion wird für einen sehr engen spektralen Bereich bestimmt, während die Fluoreszenz generell spektral breiter ist. Desweiteren ist die IRF für die im Experiment verwendeten Detektoren stark abhängig von der Wellenlänge des detektierten Lichtes. Es ist also nicht verwunderlich, dass keine perfekte Übereinstimmung möglich ist. Die Diskrepanz des Untergrundes kommt durch die

verschiedene Sensibilität der Detektoren oder ungleichmäßiges Justieren zustande und ist im akzeptablen Bereich. Der Unterschied wird während des Fittens durch den G-Faktor in den Gleichungen 3.4 bis 3.11 berücksichtigt und ausgeglichen.

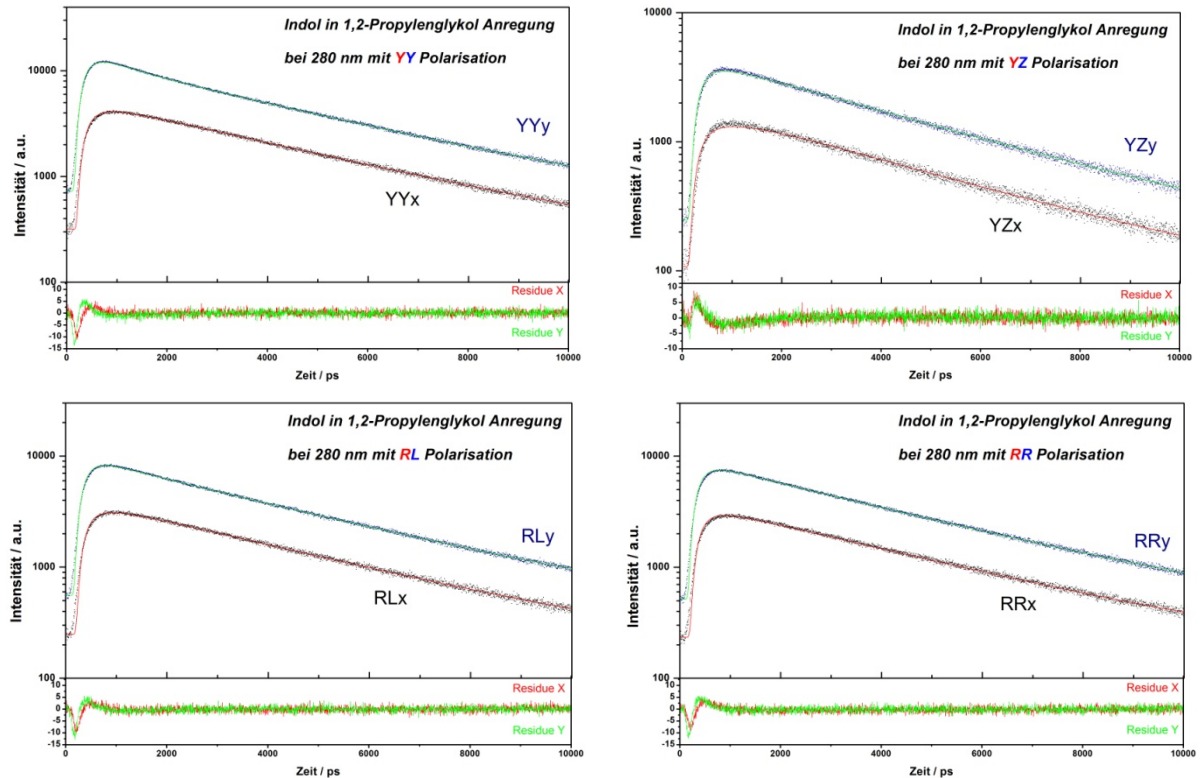


Abbildung 4.15: Übersicht über die Indol-Fluoreszenz einer Indol-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 280 nm und allen relevanten Polarisationen.

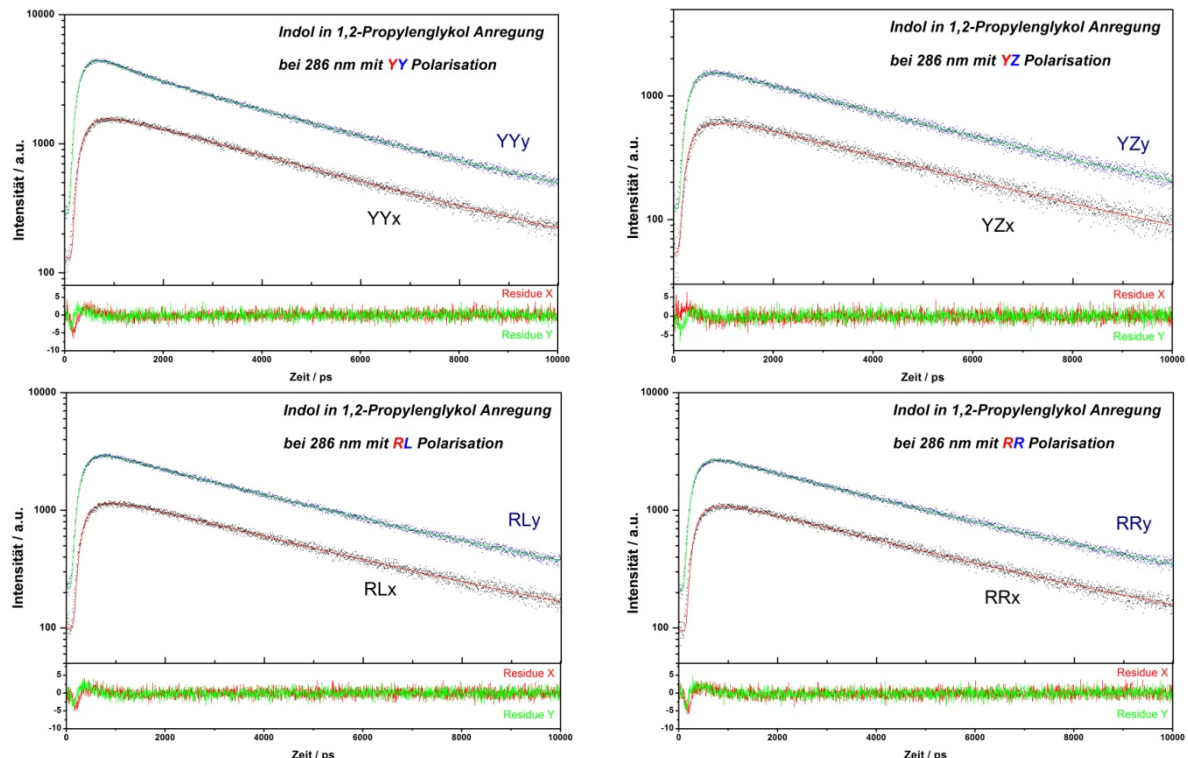


Abbildung 4.16: Übersicht über die Indol-Fluoreszenz einer Indol-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 286 nm und allen relevanten Polarisationen.

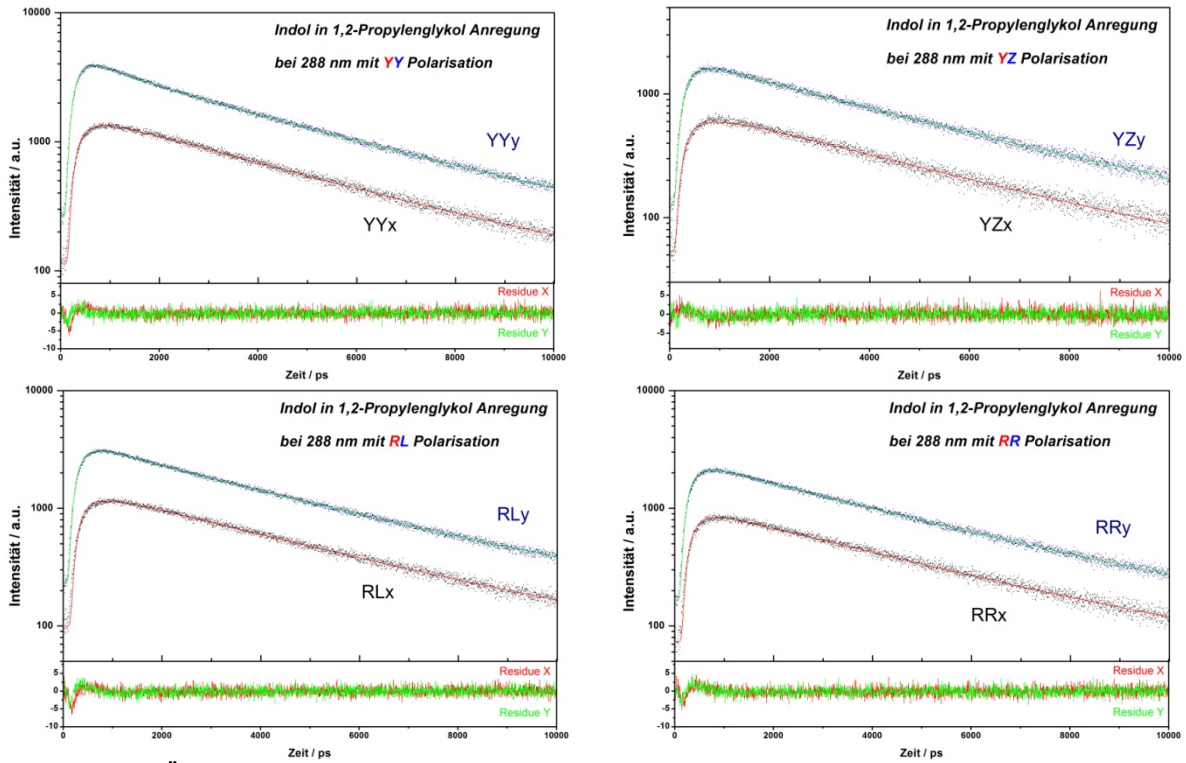


Abbildung 4.17: Übersicht über die Indol-Fluoreszenz einer Indol-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 288 nm und allen relevanten Polarisationen.

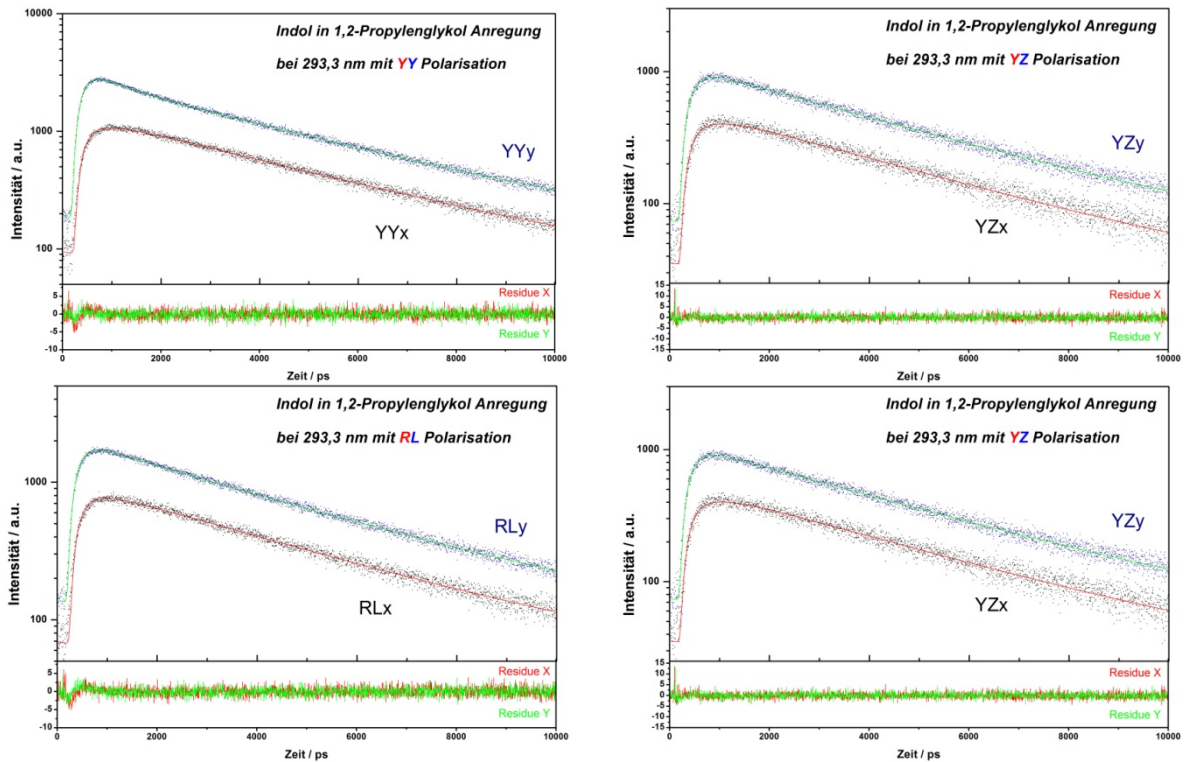


Abbildung 4.18: Übersicht über die Indol-Fluoreszenz einer Indol-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 293,3 nm und allen relevanten Polarisationen.

Tabelle 4.12: Indol in Propylenglykol. Anisotropie und Polarisationsgrad in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Sowie die Fluoreszenzlebensdauer als auch die Rotationskorrelationszeit wurden über alle Wellenlängen gemittelt. Für die Wellenlänge 268 nm wurden nur zwei Werte aufgenommen. Aus diesem Grund ist die Standardabweichung nicht sehr relevant; Die Daten für die Wellenlängen 268, 287 und 289 nm wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Tawfik Al-Hadhuri der Arbeitsgruppe Laserchemie des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie der TU Braunschweig bestimmt.

Wellenlänge	Anisotropie r_0	Polarisationsgrad Ω	Fluoreszenzlebensdauer τ_F (ps)	Rotationskorrelationszeit τ_r (ps)
268	0.131	0.73 ± 0.01	3769 ± 158	725 ± 61
280	0.130 ± 0.002	0.71 ± 0.06		
286	0.139 ± 0.001	0.73 ± 0.02		
287	0.163 ± 0.001	0.85 ± 0.03		
288	0.126 ± 0.002	0.85 ± 0.02		
289	0.152 ± 0.002	0.88 ± 0.03		
293.3	0.161 ± 0.004	0.70 ± 0.03		

Tabelle 4.12 gibt einen Überblick über die Standardanisotropie r_0 im Falle einer Anregung mit linear parallel polarisiertem Licht in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Desweiteren wird der Polarisationsgrad Ω sowie die Fluoreszenzlebensdauer τ_F als auch die Rotationskorrelationszeit τ_r gezeigt. Die Fluoreszenzlebensdauer und die Rotationskorrelationszeit wurden für alle Wellenlängen gemittelt, da sie keine systematische Variation der Wellenlänge aufwiesen. Generell sind die Abweichungen der Anisotropie sowie des Polarisationsgrades sehr gering ($< 10\%$) und sämtliche Veränderungen der Werte werden durch die Variation der Bedingungen verursacht, das heißt durch die Veränderung der Anregungsenergie. Abbildung 4.19 stellt den Sachverhalt noch einmal in übersichtlicher Form dar. Der spektrale Bereich von 267 nm bis 287 nm wird allein durch den L_a -Zustand bestimmt. Auffällig ist die Variation der Anisotropie um 290 nm und das Minimum der Anisotropie bei 288 nm. Auch wenn hier der Verdacht eines Artefaktes bei der 288 nm Messung aufkommt, so sind die Abweichungen deutlich außerhalb der Fehlergrenzen und es handelt sich hier um ein bereits beobachtetes Phänomen und die gemessenen Daten stimmen prinzipiell gut mit dem von Lakowicz publiziertem überein^[60]. Das Minimum entsteht durch den Überlapp des L_a - und L_b -Zustandes bei 288 nm. Der niedrige Wert der Anisotropie kommt dann durch die gleichzeitige Emission aus beiden, verschieden orientierten Zuständen. Er ergibt sich als Mittelwert der Werte für die einzelnen Zustände. Welchen tatsächlichen Wert L_b annimmt, lässt sich nur schwer abschätzen. Dazu müssten die genauen Anteile der Absorption beider Zustände bei 288 nm bekannt sein. Wird davon ausgegangen, dass beide Zustände zu jeweils 50 % zur Anisotropie beitragen, würde sich ein Wert für r_{0Lb} von 0,0945 ergeben. Da, wie zuvor erwähnt, der L_b -Zustand energetisch sehr scharf ist, steigt die

Anisotropie bereits bei 289 nm wieder an. Hier wird die Fluoreszenz erneut durch die Ausläufer des L_a -Zustandes dominiert.

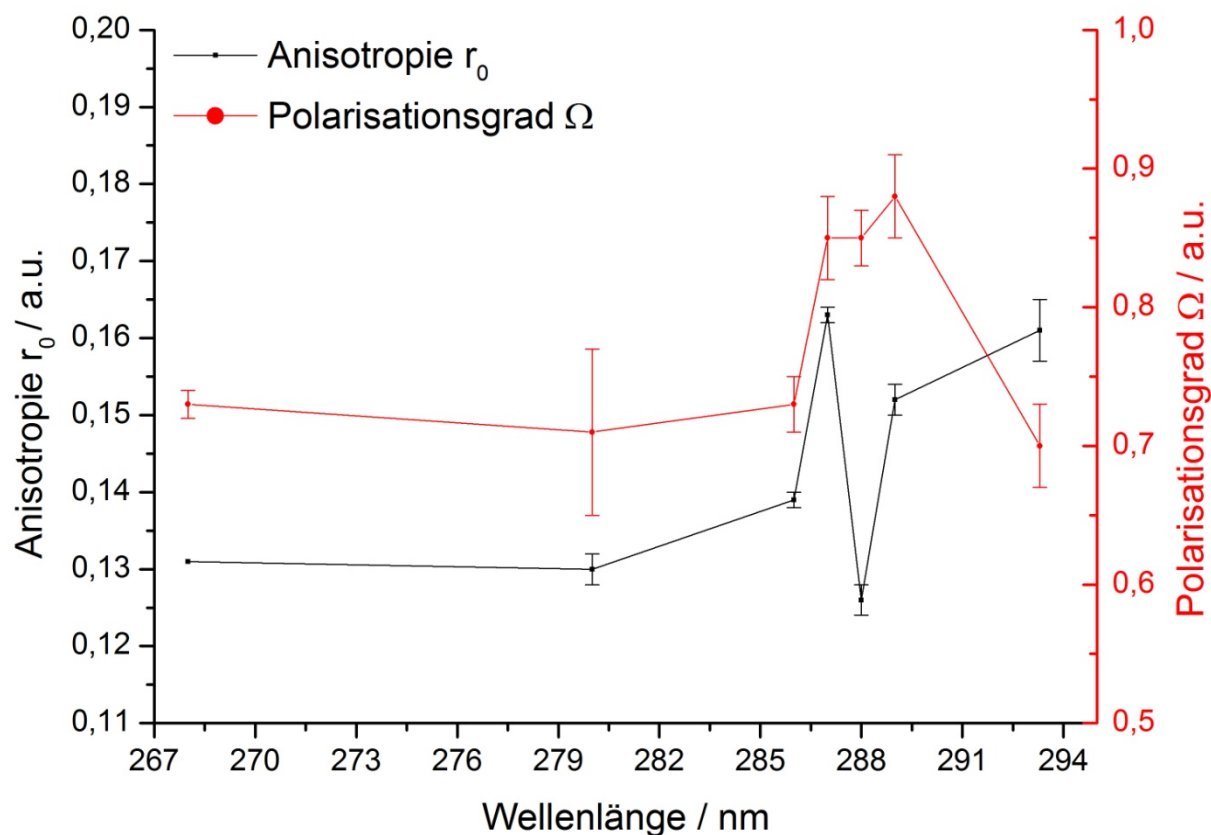


Abbildung 4.19: Abhängigkeit der Anisotropie sowie des Polarisationsgrades von der Anregungswellenlänge für Indol in Propylenglykol bei 25 °C; Die Daten für die Wellenlängen 268, 287 und 289 nm wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Tawfik Al-Hadhuri der Arbeitsgruppe Laserchemie des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie der TU Braunschweig bestimmt.

Der Polarisationsgrad bleibt von diesen Effekten unberührt. Anderson et. al. machten ähnliche Beobachtungen, wobei der Polarisationsgrad bei ihnen Werte nahe des theoretischen Maximums von 1,5 annahm^[57]. Der Unterschied liegt dort jedoch im Lösungsmittel. So verwendeten sie Hexan anstatt von Propylenglykol. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass polare Lösungsmittel zu einer Depolarisation von Indol führen.

Tabelle 4.13 stellt die Abhängigkeit der M-Parameter von der Anregungswellenlänge für Indol dar. Die Werte für 268 nm sind nur durch zwei Messungen bestimmt, so dass von einer deutlich höheren Ungenauigkeit, als es die Standardabweichung vermuten lässt, auszugehen ist. Daher werden diese 268 nm Werte nicht in die Diskussion mit einbezogen. Die Parameter $M_0(1,1)$, $M_2(1,1)$ und $M_2(1,2)$ können ähnlich wie beim DMQ-Molekül als Null angenommen werden, da die Abweichungen dieser Werte in der selben Größenordnung liegen, wie die Werte selbst. Die einzige Ausnahme bildet der Wert für $M_2(1,2)$ bei einer

Anregungswellenlänge von 288 nm. An diesem Punkt liegt ebenfalls das Minimum in dem Anisotropiespektrum (Abb. 4.19). Da $M_2(1,2)$ in diesem Fall einen Wert ungleich Null

Tabelle 4.13: M-Parameter für Indol gelöst in 1,2-Propylenglykol in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge; Alle Werte wurden jeweils auf $M_0(0,0)$ normiert. Die rot markierten Werte besitzen nur eine unzureichende Statistik; Die Daten für die Wellenlängen 268, 287 und 289 nm wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Tawfik Al-Hadhuri der Arbeitsgruppe Laserchemie des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie der TU Braunschweig bestimmt.

$M_{Ke}(R,R')$	268 nm	280 nm	286 nm	287 nm	288 nm	289 nm	293,3 nm
M0(0,0)	1	1	1	1	1	1	1
M0(1,1)	-0.07 ± 0.03	-0.06 ± 0.11	0.04 ± 0.05	0.06 ± 0.08	-0.01 ± 0.06	0.03 ± 0.09	0.01 ± 0.09
M0(2,2)	1.09 ± 0.02	0.96 ± 0.10	1.02 ± 0.04	1.45 ± 0.08	1.41 ± 0.05	1.56 ± 0.06	0.96 ± 0.06
M2(1,1)	0.11 ± 0.02	-0.03 ± 0.18	-0.06 ± 0.10	-0.22 ± 0.20	-0.08 ± 0.03	-0.25 ± 0.21	-0.02 ± 0.10
M2(0,2)	0.51 ± 0.01	0.40 ± 0.05	0.44 ± 0.03	0.59 ± 0.05	0.41 ± 0.01	0.54 ± 0.05	0.53 ± 0.02
M2(1,2)	-0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.26	0.12 ± 0.13	0.29 ± 0.29	0.18 ± 0.03	0.38 ± 0.34	0.12 ± 0.13
M2(2,2)	0.41 ± 0.01	0.44 ± 0.09	0.49 ± 0.05	0.86 ± 0.12	0.69 ± 0.02	0.94 ± 0.10	0.52 ± 0.10

annimmt, kann kein symmetrischer Zweiphotonentensor vorliegen (Vgl. Kapitel 2.1.3). Dies deutet auf eine Mischung an Zuständen unterschiedlicher Symmetrie hin, die angeregt werden. Viel mehr noch liegt hier ein deutliches Indiz dafür vor, dass $M_2(1,2)$ nur für den L_b -Zustand einen Wert ungleich Null annimmt bzw. konkret den Wert 0,18 besitzt, da bei den anderen Anregungsenergien, welche hauptsächlich durch den L_a -Zustand dominiert werden, $M_2(1,2)$ immer Null ist (ausgenommen der Wert für 268 nm, welcher aufgrund unzureichender Statistik nicht berücksichtigt wird).

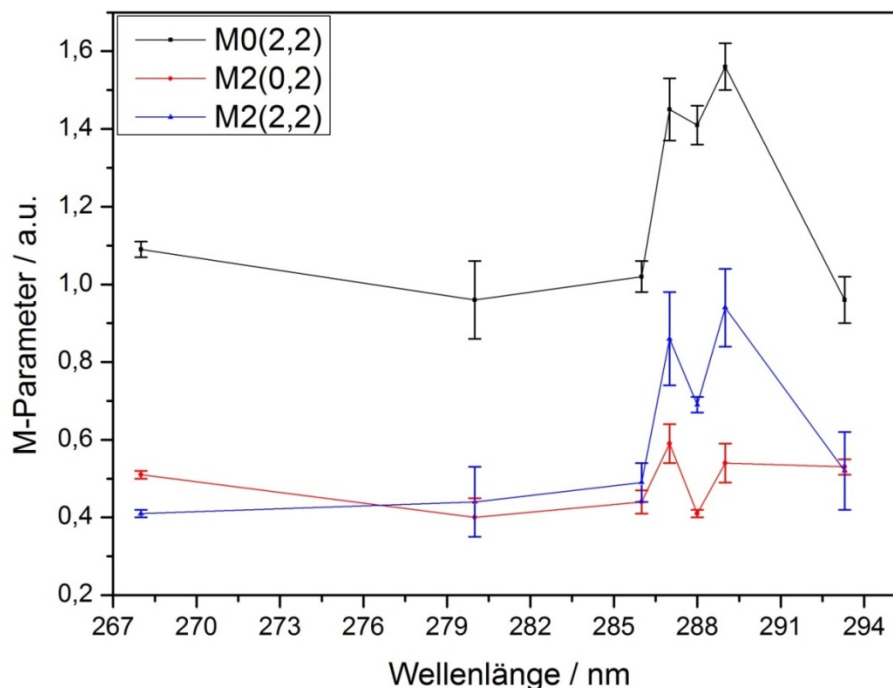


Abbildung 4.20: Die relevanten M-Parameter in Abhängigkeit von der Wellenlänge für Indol in Propylenglykol; Die Daten für die Wellenlängen 268, 287 und 289 nm wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Tawfik Al-Hadhuri der Arbeitsgruppe Laserchemie des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie der TU Braunschweig bestimmt.

Die relevanten Parameter für Indol sind $M_0(2,2)$, $M_2(0,2)$ und $M_2(2,2)$. Sie sind in Abbildung 4.20 gegen die Anregungswellenlänge dargestellt. Auffällig sind die Veränderungen im Bereich von 286 nm bis 290 nm. Die Trends ähneln denen im Anisotropiespektrum. Auch wenn die Abweichungen für $M_0(2,2)$ keine genauen Aussagen zulassen, so deuten alle drei Parameter auf ein Minimum bei 288 nm hin. Es liegen somit Indizien vor, dass an diesem Punkt erneut die Mischung des L_a - und L_b -Zustands für die Abnahme der Werte zuständig ist. Würden beide Zustände gleich stark angeregt werden und in einem Winkel von 90° zueinander orientiert sein, wäre es möglich die einzelnen M-Parameter für den L_b -Zustand zu bestimmen. An diesem Punkt wird darauf verzichtet, da die genauen Anteile der beiden Zustände nicht bekannt sind. Da sowohl $M_0(2,2)$ als auch $M_2(2,2)$ von allen Elementen des Zweiphotonentensors abhängig sind, lassen ihre Werte keine direkten Rückschlüsse auf die Symmetrie des Übergangs zu. Lediglich $M_2(0,2)$ weist darauf hin, dass ein nicht-totalsymmetrischer Übergang vorliegt.

4.2.3 Tryptophan und Tryptophanderivate

Tryptophan ist neben Tyrosin und Phenylalanin eine der wenigen Aminosäuren, welche eine messbare natürliche Fluoreszenz besitzt. Es absorbiert Licht im Bereich von 250 bis 300 nm. Aus diesem Grund eignet sich Tryptophan hervorragend für Untersuchungen mit der Zweifarben-Zweiphotonen-Technik. Anmerkend sei erwähnt, dass es sich bei Tryptophan ausschließlich um L-Tryptophan handelt, es sei denn, es wird speziell auf das nicht natürliche D-Diastereomer verwiesen. Ziel der Messungen ist es, einen Satz an M-Parametern zu bestimmen und mit anderen Tryptophanderivaten zu vergleichen, um den Weg zu Messungen an komplexeren Molekülen, wie zum Beispiel Proteinen, zu ebnen.

Zusätzlich zum L-Tryptophan wurden dazu die folgenden Derivate untersucht: D-Tryptophan, N_{α} -(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-tryptophan (Boc-Trp-OH) und *N*-Acetyl-L-tryptophanamid (NATA). Diese Derivate wurden ausgesucht, um systematisch die freien funktionellen Gruppen des Tryptophans abzuschirmen und somit deren Effekt auf die molekularen Parameter zu untersuchen. Es besteht dadurch die Möglichkeit Tryptophan so zu untersuchen, als wäre es in einem größeren Protein gebunden. Es existieren darüber hinaus noch weitere Wechselwirkungen, die aufgrund geringerer Relevanz in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden müssen.

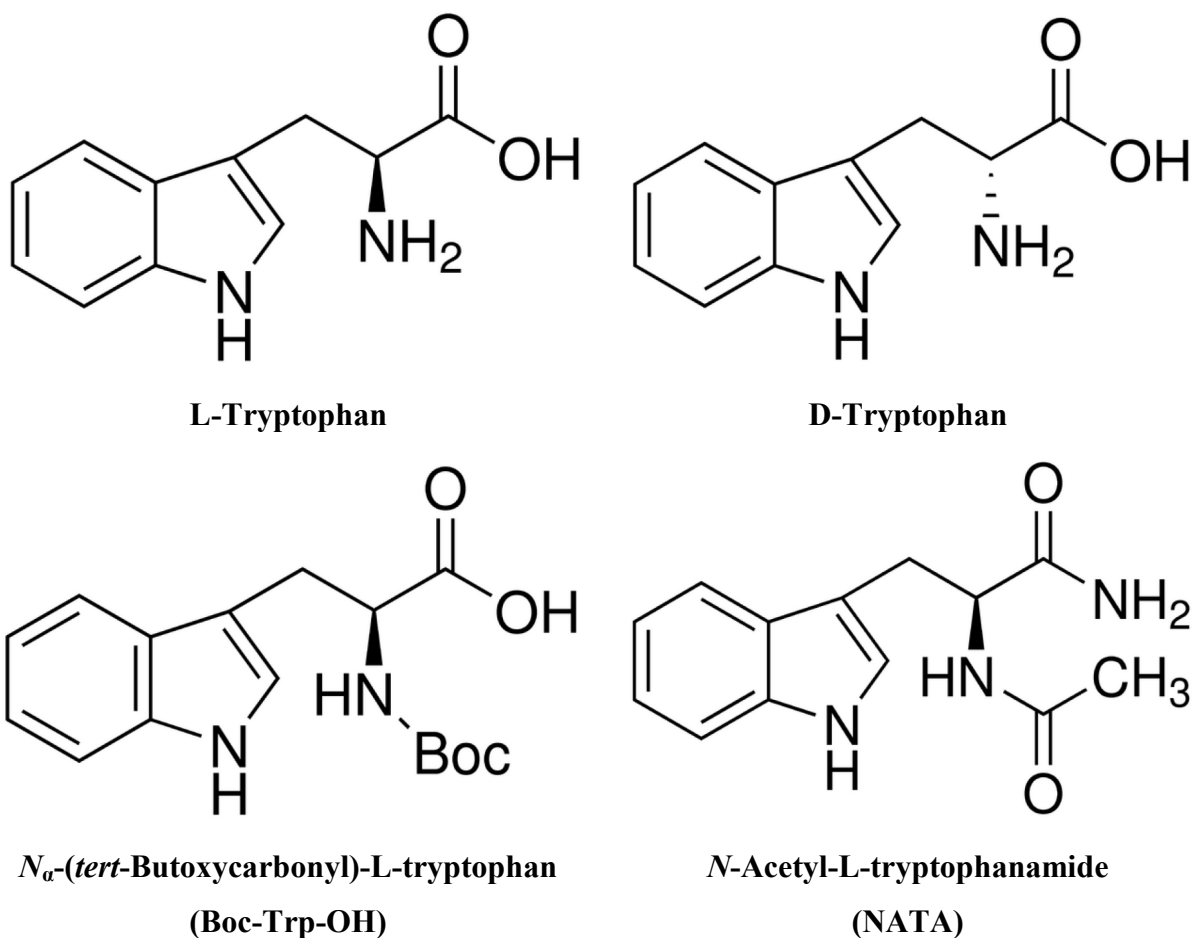


Abbildung 4.21: Strukturformeln von L-Tryptophan, D-Tryptophan, Boc-Trp-OH und NATA

Im Folgenden werden die Fluoreszenzdaten von L-Tryptophan bei Anregungswellenlängen von 280 nm, 286 nm und 288 nm in Abbildung 4.22 bis 4.30 dargestellt. Anschließend folgen die Fluoreszenzkurven für D-Tryptophan und Boc-Trp-OH mit Anregungen bei jeweils 280 nm. Abschließend werden die Fluoreszenzkurven für NATA mit Anregungen bei 280 nm, 286 nm, 288 nm und 293 nm gezeigt. Jede Messung besteht aus vier verschiedenen Polarisationskombinationen mit insgesamt acht Fluoreszenzkurven, wovon jeweils zwei in einer Grafik untergebracht sind. Im unteren Teil der Grafiken sind die entsprechenden Abweichungen der Fits von den Datenpunkten angegeben.

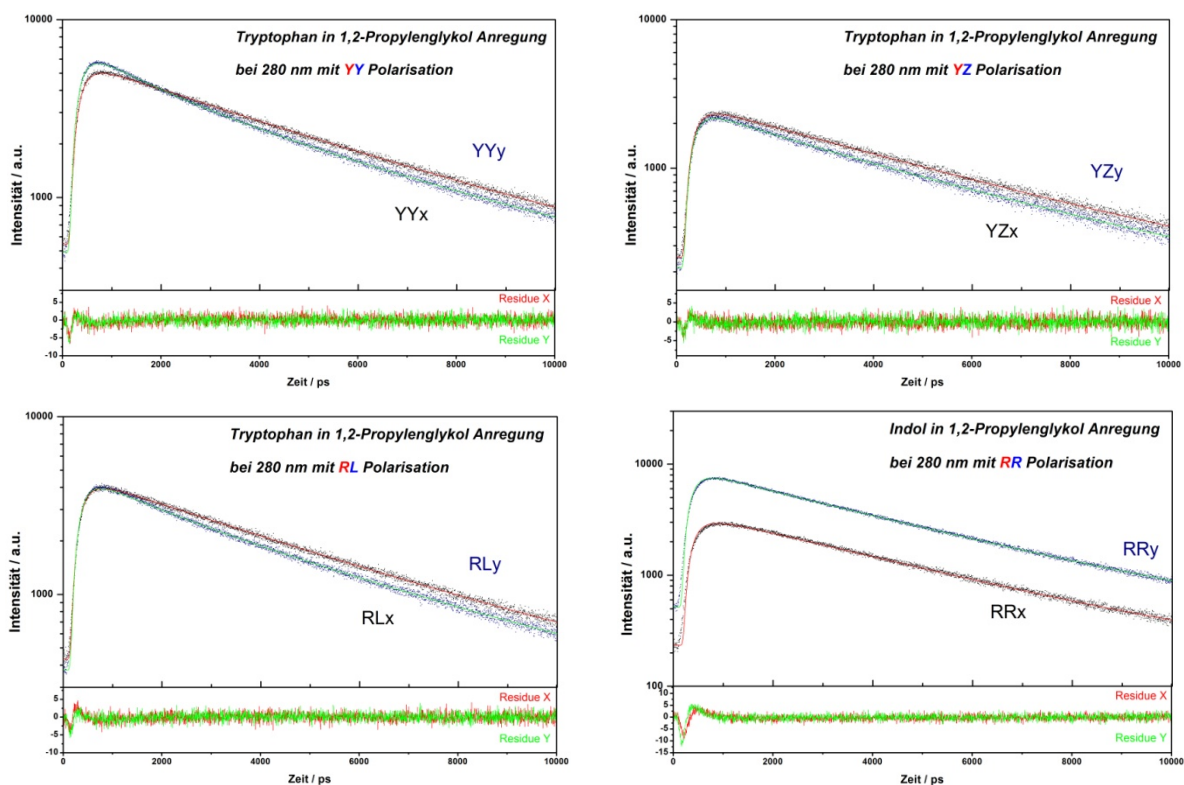


Abbildung 4.22: Übersicht über die L-Tryptophan-Fluoreszenz einer Tryptophan-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 280 nm und allen relevanten Polarisationen.

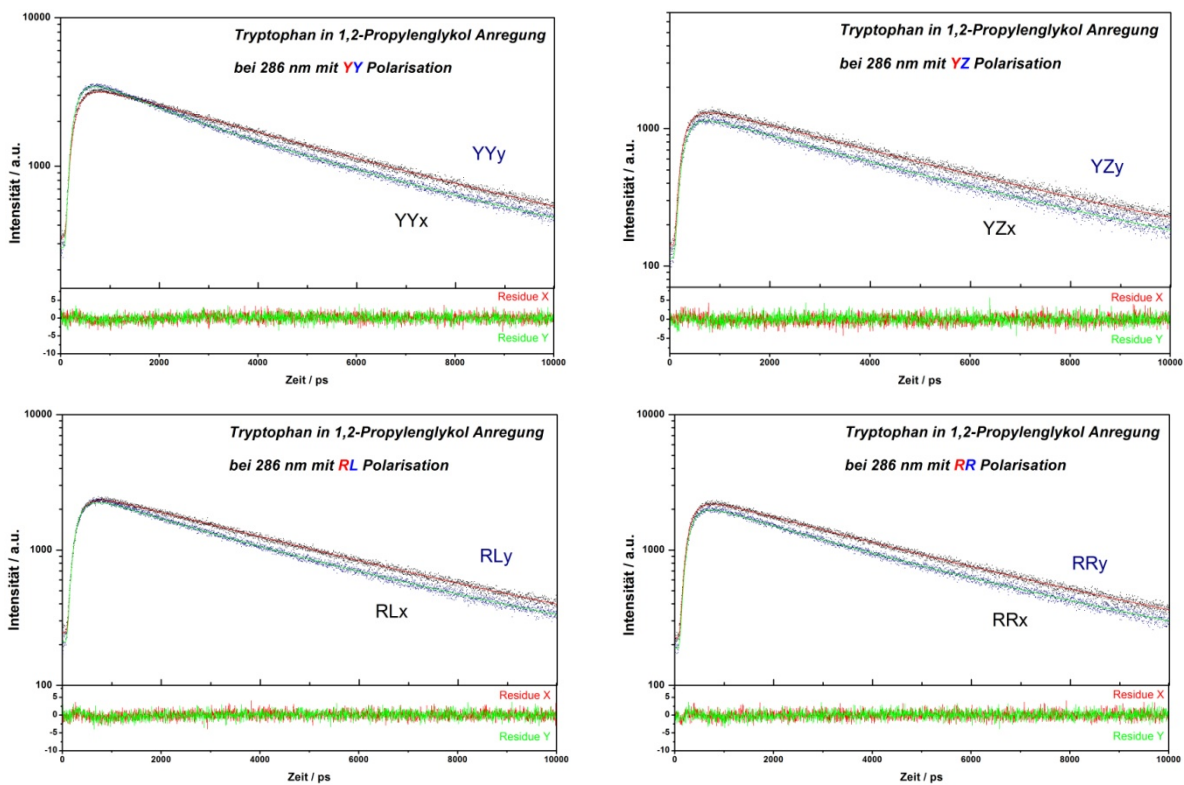


Abbildung 4.23: Übersicht über die L-Tryptophan-Fluoreszenz einer Tryptophan -1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 286 nm und allen relevanten Polarisationen.

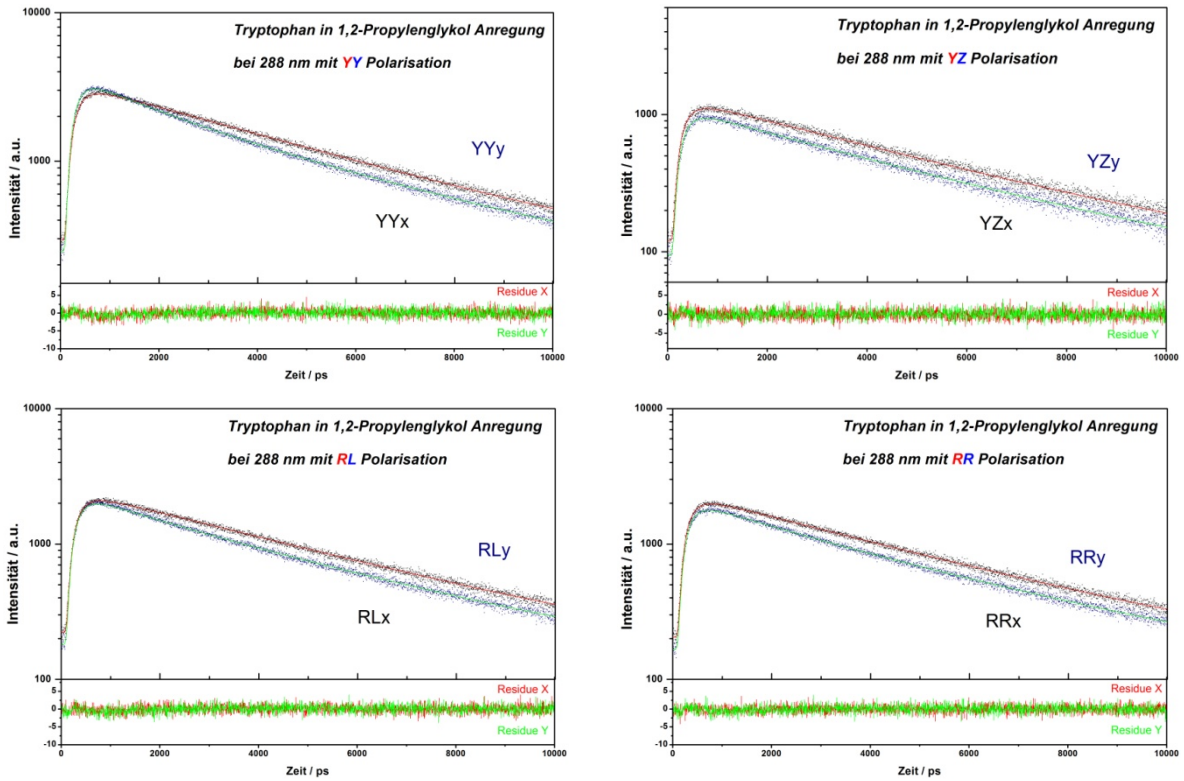


Abbildung 4.24: Übersicht über die L-Tryptophan-Fluoreszenz einer Tryptophan -1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 288 nm und allen relevanten Polarisationen.

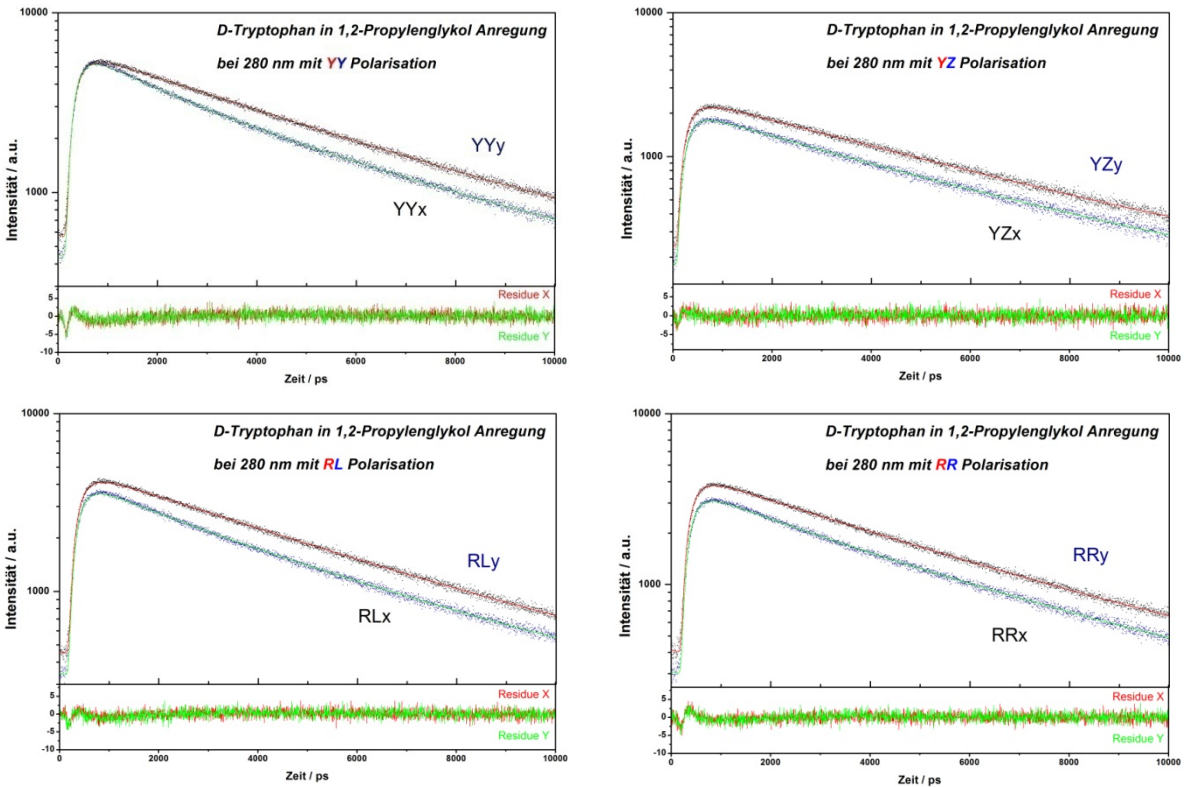


Abbildung 4.25: Übersicht über die D-Tryptophan-Fluoreszenz einer D-Tryptophan -1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 280 nm und allen relevanten Polarisationen.

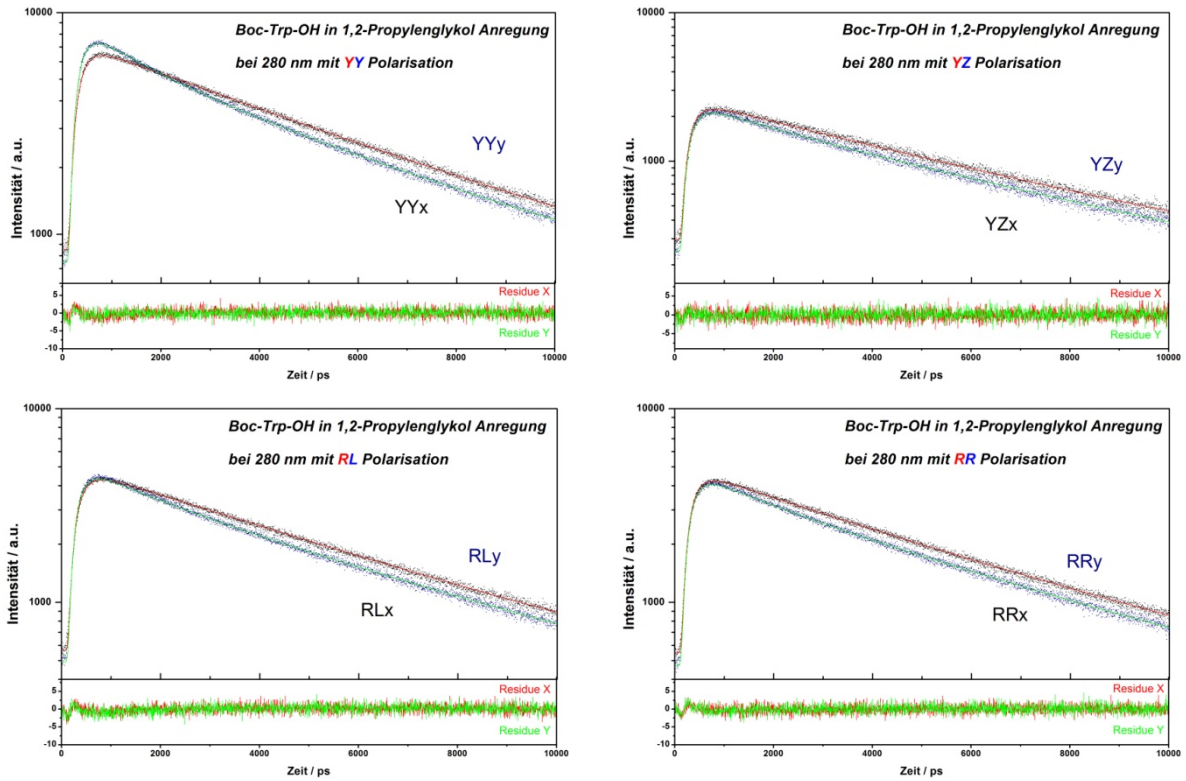


Abbildung 4.26: Übersicht über die Boc-Trp-OH-Fluoreszenz einer Boc-Trp-OH-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 280 nm und allen relevanten Polarisationen.

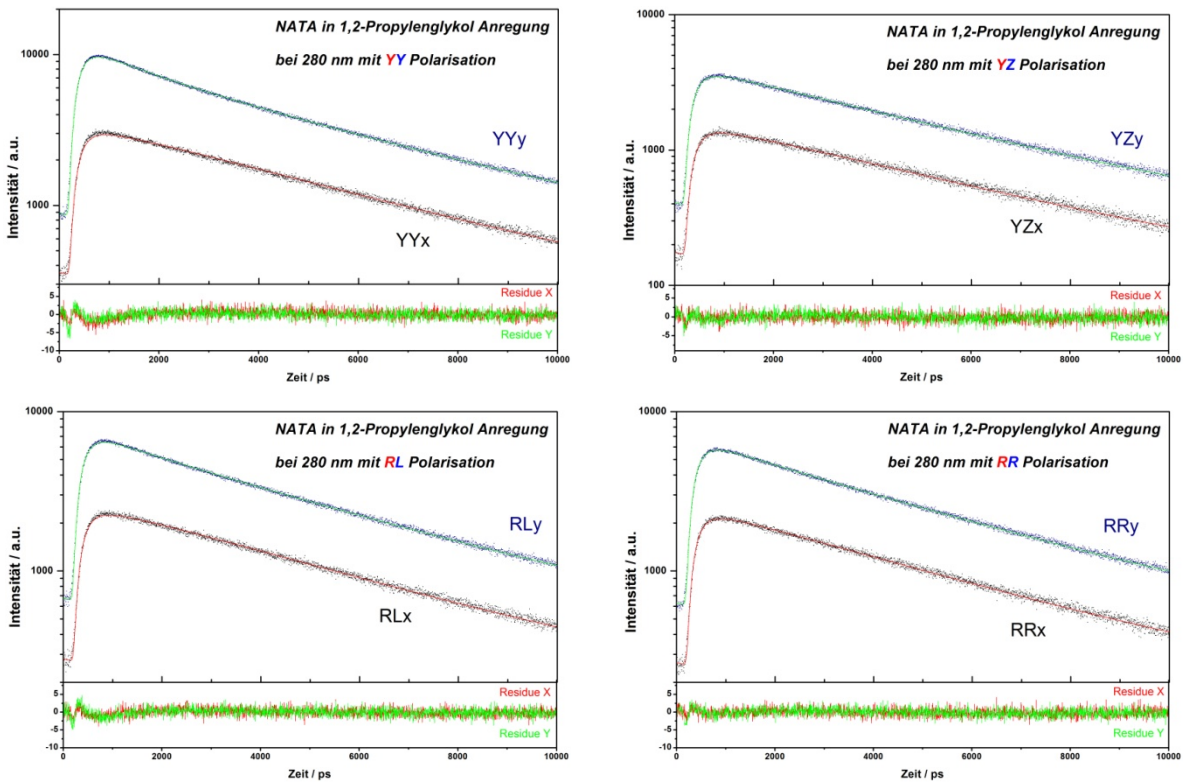


Abbildung 4.27: Übersicht über die NATA-Fluoreszenz einer NATA-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 280 nm und allen relevanten Polarisationen.

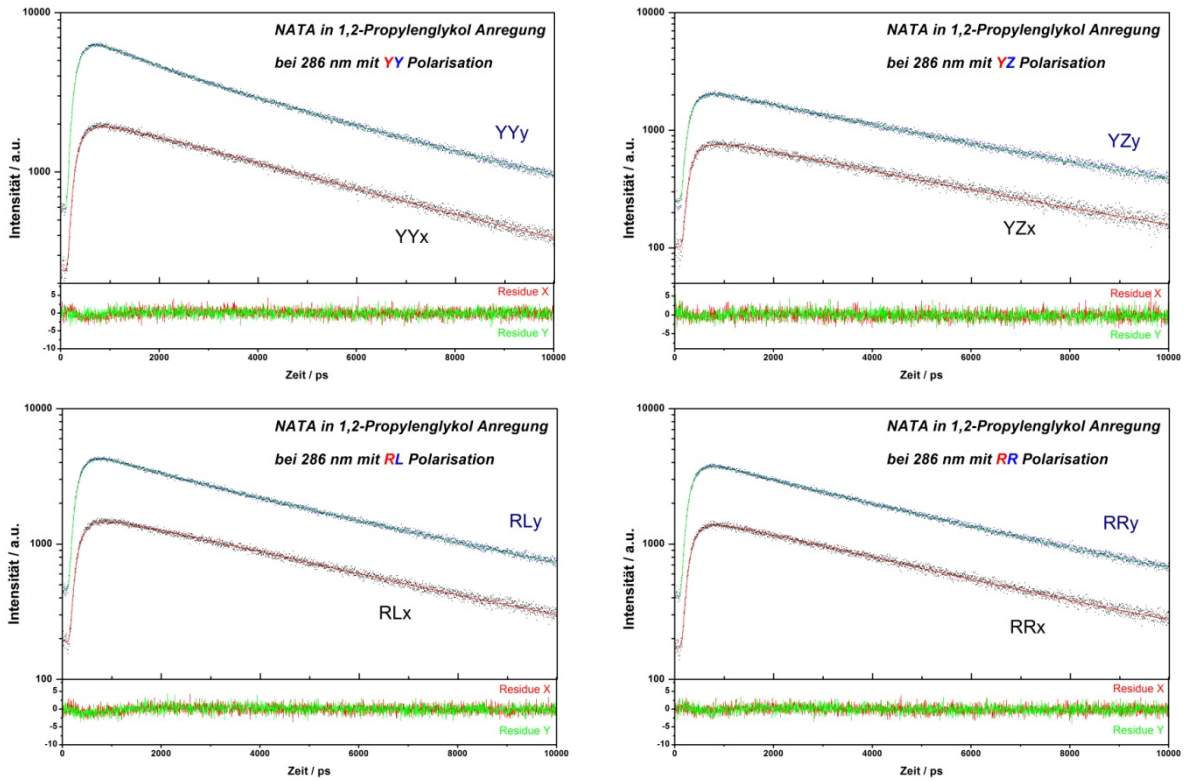


Abbildung 4.28: Übersicht über die NATA-Fluoreszenz einer NATA -1,2-Propylen glykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 286 nm und allen relevanten Polarisationen.

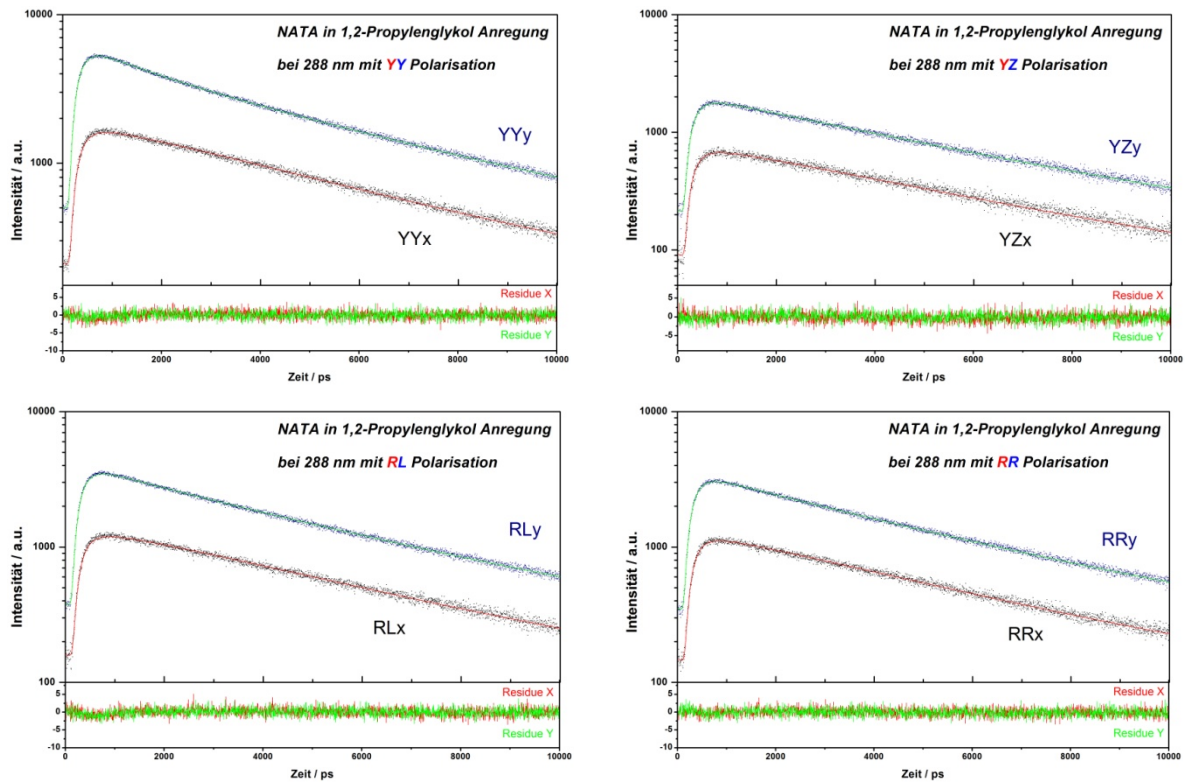


Abbildung 4.29: Übersicht über die NATA-Fluoreszenz einer NATA -1,2-Propylen glykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 288 nm und allen relevanten Polarisationen.

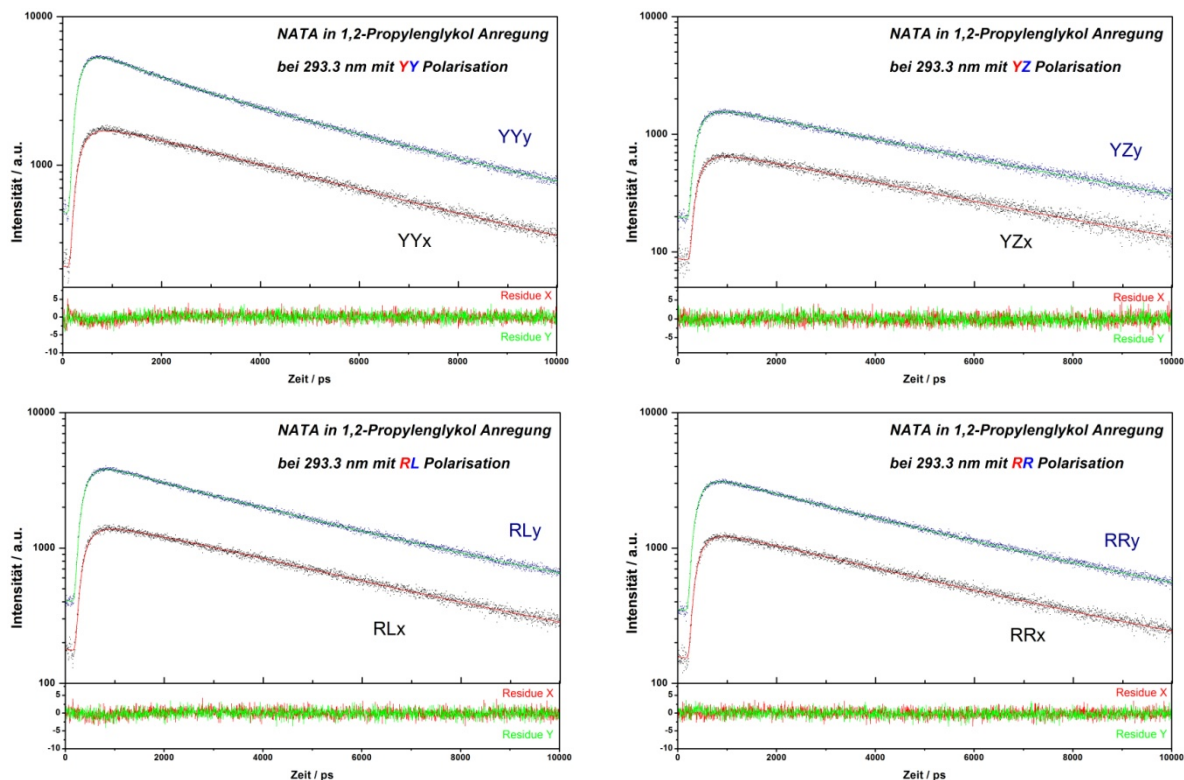


Abbildung 4.30: Übersicht über die NATA-Fluoreszenz einer NATA-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 293,3 nm und allen relevanten Polarisationen.

Die Analyse der Fluoreszenzdaten des Tryptophans wirft neue Schwierigkeiten auf. Die bisher verwendete monoexponentielle Fitroutine beschränkt sich nur auf eine Fluoreszenzlebensdauer. Für die Moleküle Indol und NATA gibt es keine direkten Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer Fluoreszenzlebensdauern durch starke Abweichungen des Fits oder deutliche Trends in den Residuen. Ein monoexponentieller Fit ist somit gerechtfertigt. Warum NATA kein biexponentielles Verhalten zeigt, konnte nicht geklärt werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass falls zwei Fluoreszenzlebensdauern für NATA vorliegen, eine der beiden nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtfluoreszenz besitzt und sich somit nicht genau analysieren lässt. Eine andere Vermutung wäre, dass eine sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer im Bereich der IRF oder kürzer vorliegt und damit sich nicht von der IRF trennen lässt. Dies ist durchaus vorstellbar, da die IRF nahe des UV-Bereichs des Spektrums sehr breit wird. Im vorliegenden Fall besitzt die IRF eine Halbwertsbreite von 256 ps. Kürzere Fluoreszenzlebensdauern wären durchaus denkbar. Die Analyse von L-Tryptophan, D-Tryptophan und Boc-Trp-OH deutet jedoch eindeutig auf ein biexponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenz hin. Mathematisch und programmiertechnisch stellt dies kein Problem dar, da eine weitere Fluoreszenzlebensdauer lediglich einen weiteren Summanden in den Gleichungen 3.4 bis 3.11 bedeutet. Das Problem für Anisotropiemessungen ist aber, dass durch die Anisotropie und die Rotationskorrelationszeit

bereits eine Erweiterung auf ein biexponentielles Problem stattgefunden hat und eine weitere Fluoreszenzlebensdauer eine Erweiterung auf ein triexponentielles Problem bedeutet. Triexponentielle Abklingkurven lassen sich aber nur dann genau analysieren, wenn eine sehr hohe Fluoreszenzintensität vorliegt (vgl. Kapitel 4.1 und Istratov et al.^[48]). Während der Sporenmessungen (Kapitel 4.1) ist dies durchaus der Fall gewesen. Für Tryptophan und Derivate ist die Intensität zu gering für einen triexponentiellen Fit. Aus diesem Grund ist es nötig, die Fluoreszenzlebensdauern vor dem eigentlichen Fit zu bestimmen, um diese als fixe Parameter nutzen zu können. Realisiert wird dies durch einen biexponentiellen Fit der Gesamtfluoreszenz. Die Gesamtfluoreszenz ergibt sich aus der Summe der einzelnen Fluoreszenzsignale beider Detektoren. Dadurch verschwindet der Einfluss der Anisotropie und das Problem wird auf ein Biexponentielles reduziert. In Abbildung 4.30 sind die Gesamtfluoreszenz von Tryptophan bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und der entsprechende biexponentielle Fit gezeigt. Abweichungen in den Residuen gibt es nur im Bereich des Anstiegs, welche durch die IRF verursacht werden.

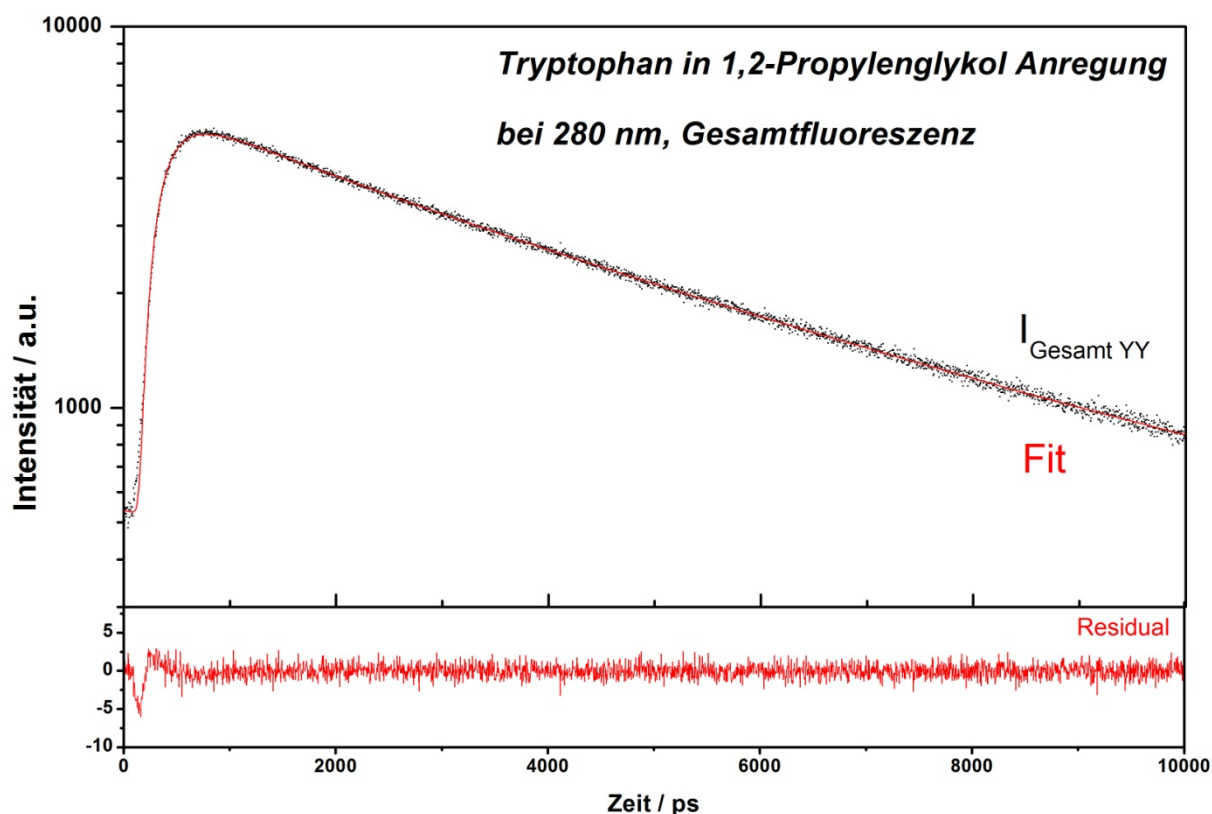


Abbildung 4.31: Übersicht über die L-Tryptophan-Gesamtfluoreszenz einer Tryptophan-1,2-Propylenglykol-Lösung in Folge der Anregung mit einer Wellenlänge von 280 nm; In rot ist die biexponentielle Funktion dargestellt, die den Daten angepasst wurde; Im unteren Bereich sind die Abweichungen vom Fit dargestellt.

Allen in Abbildungen 4.22 bis 4.30 dargestellten Fits ist eine Analyse der jeweiligen Gesamtfluoreszenz vorausgegangen.

Tabelle 4.14 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse des L-Tryptophans. Interessant ist die Veränderung der zweiten Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Es scheint, als würde der zweite Fluoreszenzzustand mit abnehmender Anregungsenergie stabilisiert bzw. das angeregte Tryptophanmolekül in seinen Bewegungen und Rotationen so eingeschränkt, dass es länger dauert die überschüssige Energie abzugeben. Die restlichen Parameter verändern sich innerhalb ihrer Fehlergrenzen nicht oder nur vernachlässigbar klein. Einzige Ausnahme bildet die Anisotropie bei 288 nm. Da das Indolmolekül als Grundgerüst dient, ist es durchaus denkbar, dass es auch hier ein ähnliches Anisotropieverhalten gibt.

Tabelle 4.14: L-Tryptophan in 1,2-Propylenglykol. Anisotropie r_0 , Polarisationsgrad Ω , Rotationskorrelationszeit τ_r , Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 sowie der Anteil der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 an der Gesamtfluoreszenz in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge.

Wellenlänge / nm	r_0	Ω	τ_1 / ps	τ_2 / ps	Anteil τ_2	τ_r / ps
280	0.136 ± 0.003	0.80 ± 0.01	4619 ± 25	1331 ± 148	0.15 ± 0.01	2065 ± 96
286	0.132 ± 0.003	0.76 ± 0.02	4593 ± 71	1965 ± 209	0.17 ± 0.03	2082 ± 20
288	0.142 ± 0.001	0.75 ± 0.01	4820 ± 211	2557 ± 313	0.27 ± 0.09	2061 ± 87

Tabelle 4.15 dient dem Vergleich der Ergebnisse der Fluoreszenzdaten für L-Tryptophan, D-Tryptophan, Boc-Trp-OH, NATA und Indol für eine Anregung bei 280 nm. Generell sind die Werte der Anisotropie eher gering und die Anisotropie nimmt im Fall von NATA den größten Wert an. Interessant ist, dass die Werte für L- und D-Tryptophan sich innerhalb ihrer Fehlergrenzen tatsächlich unterscheiden, auch wenn die Unterschiede nur sehr klein sind. Der Polarisationsgrad ist für L- und D-Tryptophan sowie NATA und Indol in einem sehr ähnlichem Bereich. Nur Boc-Trp-OH weist einen geringeren Wert auf. Die Werte unterscheiden sich aber nur minimal, so dass nur Vermutungen über den Einfluss der funktionellen Gruppen des NATAs und Boc-Trp-OHs angestellt werden können. Die ersten Fluoreszenzlebensdauern liegen in einem zu erwartenden Bereich. Mit zunehmender Anzahl an Atomen im Molekül wird dessen Bewegungsspielraum eingeschränkt und die Möglichkeit zur Abgabe der überschüssigen Energie in Form von Translation und Rotation vermindert, was zu einer längeren Fluoreszenzlebensdauer führt. Aus diesem Grund besitzt Indol die geringste und Boc-Trp-OH die größte Lebensdauer. Interessant ist das Verhalten der zweiten Fluoreszenzlebensdauer. Hier gibt es im Falle von D-Tryptophan eine deutliche Abweichung. Es ist nicht möglich diese Abweichung zu erklären und es wäre interessant Messungen zum

Beispiel mit Boc-D-Trp-OH durchzuführen, um zu klären, ob es sich um ein Artefakt in den vorliegenden Messungen handeln könnte. Die Anteile der zweiten Fluoreszenzlebensdauer an der Gesamtfluoreszenz bieten aufgrund der Fehlergrenzen wenig Spielraum für Spekulationen. Es wäre aber durchaus möglich, dass mit zunehmender Größe des Moleküls, die zweite Lebensdauer einen geringeren Stellenwert einnimmt. Die Rotationskorrelationszeiten weisen eindeutig auf eine Wechselwirkung zwischen dem Solvens und dem zu untersuchenden Molekül hin. Da die Konzentrationen für alle Proben bis auf Indol gleich sind, würden ähnliche Ergebnisse erwartet werden. Es scheint aber, dass die freien Aminosäuren ohne geschützte Funktionen eine Wechselwirkung mit dem 1,2-Propylenglykol eingehen. Es wäre durchaus denkbar, dass diese Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrückenbindungen zu Stande kommen. Im Falle des Boc-Trp-OH ist nur die Aminogruppe geschützt, was bereits zu einer verminderten Wechselwirkung und somit Rotationszeit führt. NATA besitzt keine freie funktionelle Gruppe und kann somit noch weniger Wechselwirkungen eingehen. Deshalb rotiert es am schnellsten. Eine andere Form der Wechselwirkungen könnte direkt zwischen den einzelnen Probemolekülen auftreten. Es wäre vollkommen logisch, dass die Aminosäuremoleküle untereinander wechselwirken, auch in diesem Fall wären Wasserstoffbrückenbindungen denkbar und die vorangegangene Diskussion ebenfalls akzeptabel. Messungen mit Veränderung der Konzentration waren nicht Bestandteil dieser Arbeit, könnten aber zukünftig zur Klärung des Sachverhalts dienlich sein. Im Fall von Indol wurde eine geringere Konzentration eingesetzt, da die Quantenausbeute höher ist und es ursprünglich getrennt von den Tryptophanderivaten behandelt wurde. Desweiteren ist es ein kleineres und weniger polares Molekül im Vergleich zu Tryptophan und seinen Derivaten. Aus diesem Grund liegt hier die geringste Rotationszeit vor.

Tabelle 4.15: Alle Proben wurden in 1,2-Propylenglykol gelöst und bei 280 nm angeregt. Anisotropie r_0 , Polarisationsgrad Ω , Rotationskorrelationszeit τ_r , Fluoreszenzlebensdauern τ_1 und τ_2 sowie der Anteil der Fluoreszenzlebensdauer τ_2 an der Gesamtfluoreszenz im Vergleich für diverse Tryptophanderivate und Indol.

Probe	r_0	Ω	τ_1 / ps	τ_2 / ps	Anteil τ_2	τ_r / ps
L-Tryptophan	0.136 ± 0.003	0.80 ± 0.01	4619 ± 25	1331 ± 148	0.15 ± 0.01	2065 ± 96
D-Tryptophan	0.130 ± 0.001	0.79 ± 0.02	4672 ± 106	2075 ± 204	0.16 ± 0.04	2094 ± 117
Boc-Trp-OH	0.129 ± 0.003	0.71 ± 0.03	5017 ± 42	1267 ± 56	0.11 ± 0.01	1760 ± 90
NATA	0.142 ± 0.001	0.76 ± 0.002	4539 ± 2	-	-	1558 ± 38
Indol	0.130 ± 0.002	0.71 ± 0.06	3769 ± 158	-	-	725 ± 61

Tabelle 4.16: NATA in 1,2-Propylenglykol. Anisotropie r_0 , Polarisationsgrad Ω , Rotationskorrelationszeit τ_r und Fluoreszenzlebensdauern τ_1 in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge.

Wellenlänge / nm	r_0	Ω	τ_1 / ps	τ_r / ps
280	0.142 ± 0.001	0.76 ± 0.002	4539 ± 3	1558 ± 38
286	0.140 ± 0.001	0.76 ± 0.01	4663 ± 6	1453 ± 13
288	0.149 ± 0.001	0.77 ± 0.02	4691 ± 9	1548 ± 35
293	0.139 ± 0.008	0.81 ± 0.02	4649 ± 36	1676 ± 83

Tabelle 4.16 vergleicht die Anisotropie, den Polarisationsgrad, die Fluoreszenzlebensdauer und die Rotationskorrelationszeit von NATA in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Die Anisotropie des NATAs zeigt einen ähnlichen Trend wie beim Indol und Tryptophan. Die restlichen Parameter verändern sich innerhalb ihrer Fehlergrenzen nicht oder nur vernachlässigbar klein. Einzige Ausnahme bildet die Rotationskorrelationszeit bei 286 nm. Warum dort die Rotation des Moleküls zunimmt ist nicht verstanden.

Im folgenden Abschnitt werden die M-Parameter für Tryptophan und NATA in Abhängigkeit von der Wellenlänge diskutiert. Anschließend erfolgt ein Vergleich der Tryptophanderivate. Tabelle 4.17 zeigt die M-Parameter für L-Tryptophan in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge.

Tabelle 4.17: M-Parameter für L-Tryptophan gelöst in 1,2-Propylenglykol in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge; Alle Werte wurden jeweils auf $M_0(0,0)$ normiert; Eine Abweichung von 0.00 steht für einen Wert von kleiner 0.005.

$M_{Ke}(R,R')$	280 nm	286 nm	288 nm
M0(0,0)	1	1	1
M0(1,1)	0.24 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.01
M0(2,2)	1.21 ± 0.02	1.13 ± 0.04	1.08 ± 0.02
M2(1,1)	-0.08 ± 0.02	0.00 ± 0.07	0.00 ± 0.00
M2(0,2)	0.44 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.47 ± 0.00
M2(1,2)	0.29 ± 0.04	0.20 ± 0.09	0.22 ± 0.02
M2(2,2)	0.58 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.52 ± 0.01

Insgesamt wurden drei unterschiedliche Anregungswellenlängen vermessen. Nachfolgend sollen einige Auffälligkeiten diskutiert werden. Generell sind die Änderungen der meisten Parameter gering. Der isotrope Parameter $M_0(1,1)$ verliert mit abnehmender Anregungsenergie an Bedeutung und nähert sich scheinbar Null an. Weitere Verringerungen in Korrelation mit der Anregungsenergie sind für die Parameter $M_0(2,2)$ und $M_2(2,2)$ zu erkennen. Auffällig ist, dass der Parameter $M_2(1,1)$ einen Wert sehr nahe Null annimmt und infolge dessen auf einen symmetrischen Zweiphotonentensor hindeutet. Andererseits nimmt der Parameter $M_2(1,2)$ für alle Wellenlängen einen Wert größer Null an, was wiederum für einen nichtsymmetrischen Zweiphotonentensor spricht. Es ist wahrscheinlich, dass eine Mischung von Zuständen angeregt wird, welche nicht gleich zueinander orientiert sind. Die restlichen Parameter verändern sich in den Grenzen ihrer Abweichungen nicht oder vernachlässigbar klein.

Tabelle 4.18 vergleicht die M-Parameter für NATA gelöst in 1,2-Propylenglykol in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Im Rahmen der Genauigkeit der Messungen können für alle Parameter keine oder nur vernachlässigbar kleine Abweichungen beobachtet werden. Die einzige bedeutende Abweichung ist bei dem Parameter $M_2(1,2)$ mit einer Anregungswellenlänge von 293 nm zu erkennen. Der Wert verdoppelt sich im Vergleich zur Anregung mit 288 nm und 286 nm. Es muss jedoch die Abweichung von über 30 % berücksichtigt werden. Allgemein deutet die Auswertung der M-Parameter auf einen nicht-symmetrischen Zweiphotonentensor hin.

Tabelle 4.18: M-Parameter für NATA gelöst in 1,2-Propylenglykol in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge; Alle Werte wurden jeweils auf $M_0(0,0)$ normiert;

$M_{ke}(R,R')$	280 nm	286 nm	288 nm	293 nm
M0(0,0)	1	1	1	1
M0(1,1)	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.18 ± 0.08
M0(2,2)	1.11 ± 0.01	1.11 ± 0.01	1.14 ± 0.03	1.21 ± 0.04
M2(1,1)	0.07 ± 0.02	-0.06 ± 0.04	-0.04 ± 0.07	-0.21 ± 0.13
M2(0,2)	0.49 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.50 ± 0.03	0.39 ± 0.06
M2(1,2)	0.12 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.27 ± 0.11	0.62 ± 0.18
M2(2,2)	0.51 ± 0.00	0.56 ± 0.01	0.60 ± 0.03	0.68 ± 0.06

Der Vergleich der Tryptophanderivate und Indol bei einer Anregung mit 280 nm ist in Tabelle 4.19 dargestellt. Generell lässt sich feststellen, dass die M-Parameter für alle Tryptophanderivate und Indol innerhalb ihrer Fehlerintervalle sehr ähnlich ausfallen, was den Erwartungen entspricht. Trotzdem gibt es einige interessante Unterschiede. Hervorstechend sind die Parameter $M_0(1,1)$, $M_2(1,2)$ und $M_2(1,2)$, welche bei einem Wert von Null für einen symmetrischen Zweiphotonentensor sprechen. Da diese M-Parameter für Indol und Boc-Trp-OH sehr kleine Werte bei gleichzeitig sehr großen Abweichungen besitzen, kann ein Wert von Null angenommen und von einem symmetrischen Zweiphotonentensor ausgegangen werden. Im Fall von NATA, L-Tryptophan und D-Tryptophan gewinnen diese drei Parameter mehr an Bedeutung und sie nehmen reale Werte an. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Funktionalisierung des Indols mit einer Amino- sowie Säurefunktion den Zweiphotonentensor grundlegend verändert und die Symmetrie dabei zerstört wird. Interessant ist die Tatsache, dass durch eine Veränderung der Aminofunktion mit Hilfe einer tertiären Butoxycarbonylfunktion die Symmetrie wieder hergestellt wird.

Tabelle 4.19: Alle Proben wurden in 1,2-Propylenglykol gelöst und bei 280 nm angeregt. Aufgelistet sind die M-Parameter im Vergleich für diverse Tryptophanderivate und Indol; Rot markiert sind diejenigen Parameter, die aufgrund ihrer hohen Abweichung bei gleichzeitig niedrigem Wert auf den Wert Null hindeuten.

$M_{Kc}(R,R')$	L-Tryptophan	D-Tryptophan	Boc-Trp-OH	NATA	Indol
M0(0,0)	1	1	1	1	1
M0(1,1)	0.24 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.03 ± 0.07	0.15 ± 0.02	-0.06 ± 0.11
M0(2,2)	1.21 ± 0.02	1.17 ± 0.06	0.99 ± 0.08	1.11 ± 0.01	0.96 ± 0.10
M2(1,1)	-0.08 ± 0.02	-0.07 ± 0.04	0.01 ± 0.12	0.07 ± 0.02	-0.03 ± 0.18
M2(0,2)	0.44 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.05	0.49 ± 0.01	0.40 ± 0.05
M2(1,2)	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.08	0.15 ± 0.18	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.26
M2(2,2)	0.58 ± 0.02	0.53 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.51 ± 0.00	0.44 ± 0.09

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung der Multiphotonenanregung in verschiedenen Bereichen zur Charakterisierung von biologisch relevanten Molekülen. Zum Einen wurden die Fluoreszenzlebensdauern von verschiedenen natürlichen Fluorophoren in Pilzsporen gleichzeitig bestimmt, um anschließend ihre Anteile und Verteilung bildgebend darzustellen. Zum Anderen wurden mit Hilfe vollständiger Polarisationsexperimente diverse Moleküle spektroskopisch charakterisiert. Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse der Messungen an Sporen zusammengefasst und daran anschließend die Ergebnisse der Polarisationsmessungen rekapituliert.

5.1 Sporenmessungen

Unter Zuhilfenahme der Technik der Zweiphotonenmikroskopie konnte die natürliche Fluoreszenz von *Aspergillus Ochraceus* charakterisiert werden. Dabei standen vor allem die intrinsischen Fluorophore NAD(P)H und Melanin im Fokus der Untersuchungen. Eine spektrale Differenzierung der Fluorophore erscheint zunächst unmöglich, weil die Emissions- und Absorptionsspektren von NAD(P)H und Melanin einen großen Überlapp aufzeigen. Dennoch konnte eine Unterscheidung realisiert werden, indem die Fluoreszenzlebensdauern unter Berücksichtigung der Apparatfunktion mit einer Auflösung von ca. 10 ps bestimmt wurden. Um quantitative Daten für die Fluoreszenzlebensdauer auf einer Pikosekundenskala zu erhalten, wurde die Methode der Vorwärtsfaltung genutzt. Obwohl der Anteil der Melaninfluoreszenz ca. 99 % an der Gesamtfluoreszenz beträgt, konnte in dieser Arbeit die räumliche Verteilung von Melanin und NAD(P)H in den Pilzsporen von *Aspergillus Ochraceus* beschrieben werden. Zusätzlich war es möglich zwischen freiem und enzymgebundenen NAD(P)H zu unterscheiden. Allgemein ist sehr wenig über die innere Struktur von Sporen bekannt und es wird oft davon ausgegangen, dass keine örtlich fixierten Funktionsbereiche vorliegen, da Sporen die am kompakteste Form des Lebens darstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch auf eine sehr organisierte innere Struktur der Sporen hin. Besonders Abbildung 4.5 zeigt, dass es eine klare Differenzierung zwischen Bereichen hoher Konzentrationen an enzymgebundenem NAD(P)H und Bereichen mit hauptsächlich freiem NAD(P)H gibt. Da das Verhältnis von enzymgebundenen zu freiem NAD(P)H ein Indikator für die Aktivität des Metabolismus ist, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die

Aktivität des Metabolismus in bestimmten Regionen der Spore gesteuert wird. Wie diese Regionen genau voneinander getrennt sind, zum Beispiel durch Membranen oder Ähnliches, konnte nicht festgestellt werden und wäre ein zukünftiges Forschungsobjekt. Jedoch ist allein die Tatsache, dass es eine Art Organisation innerhalb von Sporen gibt, ist bemerkenswert und komplett neu. Es zeigt außerdem, dass es eine Art räumliche Organisationsinstanz geben muss. Ob es sich dabei um Proteine oder Fettstrukturen handeln könnte, ist aber weiterhin unklar und nicht erforscht.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Fluoreszenzlebensdauern des freien und enzymgebundenen NAD(P)H im Bezug auf die Herkunft der Sporen unter verschiedenen Bedingungen. Dazu wurden drei verschiedene Nährböden benutzt auf denen die Sporen gezüchtet wurden: Malzextrakt-Agar, Haferkleie-Agar und Weizenkleie-Agar. Anschließend wurden verschiedene Proben hergestellt und untersucht: frisch geerntete, frisch gekeimte, gelagerte, gelagert gekeimte und abgetötete Sporen. Die Proben wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Krull des Instituts für Bioverfahrenstechnik bereit gestellt. Ziel war es die Veränderungen der Viabilität und des Metabolismus durch die Lagerung der Sporen quantitativ zu erforschen. Allgemein ist die Fluoreszenzlebensdauer eine von der Anregungsintensität und Konzentration des Fluorophors unabhängige Größe. Beeinflusst wird sie vor allem durch die molekulare Umgebung des Fluorophors und eignet sich damit bestens um unterschiedliche Wechselwirkungen des Fluorophors mit seiner Umgebung zu untersuchen. Die Fluoreszenzlebensdauer des freien NAD(P)H gibt grundsätzlich einen Hinweis darauf in welcher Form es vorliegt (offen oder gefaltet). Die Ergebnisse der Messungen deuten auf eine große Heterogenität der Sporen hin. Das bedeutet, dass der Entwicklungsprozess der Sporen individuell abläuft. Die Daten sind nur bei sterilisierten Proben homogen, das heißt nur tote Sporen verhalten sich für einen Nährboden gleich. Dennoch unterscheiden sich die Fluoreszenzlebensdauern des freien NAD(P)H je nach Nährboden.

Die Ergebnisse der Messungen der Fluoreszenzlebensdauern des enzymgebundenen NAD(P)Hs deuten auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Metabolismen hin. Begründet wird diese Annahme durch die signifikant unterschiedlich langen Fluoreszenzlebensdauern der verschiedenen Proben. Generell könnte von einem Entwicklungsmetabolismus und einem Überlebensmetabolismus gesprochen werden. Der Entwicklungsmetabolismus wurde bei den frisch geernteten und den gekeimten Sporen beobachtet und anhand der längeren Fluoreszenzlebensdauern des enzymgebundenen NAD(P)H charakterisiert. Hier liegen die

Fluoreszenzlebensdauern in einem Bereich von 3,5 bis 4,1 ns. Während der Entwicklung und Keimung wirkt anscheinend ein ähnliches Set an Enzymen welche NAD(P)H binden. Im Gegensatz dazu liegen die Fluoreszenzlebensdauern für die gelagerten und abgetöteten Sporen in einem Bereich von 2,7 bis 3,4 ns und deuten auf einen Überlebensmetabolismus hin. Es liegt die Vermutung nahe, dass während dieser Phase, die zelleigenen Reserven verbraucht werden und andere Enzyme, welche NAD(P)H binden können, eine Rolle spielen. Interessant ist, dass die Sporen selbst nach der Sterilisation noch über enzymgebundenes NAD(P)H verfügen. Die Messungen unterstützen damit den Fakt, dass NAD(P)H während des Zelltodes eine entscheidende Rolle spielt^[10]. Eine Ausnahme der vorherigen Betrachtungen bilden die Sporen, welche auf Weizenkleie-Agar gezüchtet wurden. Ihre Heterogenität ist so hoch, dass sie keine spezifischen Trends erkennen lassen. Als Konsequenz daraus würde sich dieses Nährmedium für die industrielle Anwendung nicht eignen, da Abweichungen in den Ausbeuten der Prozesse zu erwarten wären.

Eine weitere wichtige Größe zur Einschätzung der Aktivität des Metabolismus der Sporen ist das Verhältnis der Anteile der Fluoreszenzlebensdauer von enzymgebundenem zu freiem NAD(P)H. Allgemein deutet ein größerer Fluoreszenzanteil an enzymgebundenem NAD(P)H auf einen aktiveren Metabolismus hin. Verdeutlicht wird dies, durch die Ergebnisse der abgetöteten Sporen, wo die Fluoreszenzanteile an gebundenem NAD(P)H mit rund 30 - 40 % am geringsten sind. Desweiteren zeigen die Werte für die abgetöteten Sporen die geringsten Abweichungen auf, weshalb von einer großen Homogenität der Sporen ausgegangen werden kann. Die meisten Fluoreszenzanteile mit rund 60 - 75 % an gebundenem NAD(P)H finden sich bei den frisch geernteten und anschließend gekeimten Sporen wieder. Dieser Effekt ist zu erwarten, da der Metabolismus durch die Keimung stark angeregt wird. Interessant sind die Daten für die gelagerten Sporen. Mit Fluoreszenzanteilen an gebundenem NAD(P)H von rund 45 - 55 % ist der Metabolismus im Gegensatz zu gängigen Annahmen durchaus aktiv. Vermutlich findet hier der Überlebensmetabolismus statt bei dem wichtige, eingelagerte Metabolitsubstanzen verbraucht werden. Auf eine Veränderung des Enzymhaushalts deuteten bereits die Fluoreszenzlebensdauer-messungen hin. Eine Folge davon ist die verminderte Fähigkeit zur Keimung. Die Daten für die gelagert und anschließend gekeimten Sporen belegen diese Vermutung (~37 - 43 % gebundenes NAD(P)H). Mit einem Fluoreszenzanteil von 30 - 40 % gebundenem NAD(P)H liegen die frisch geernteten Sporen in dem gleichen Bereich wie die abgetöteten. Der Unterschied ist aber die Fähigkeit zur Keimung. Während abgetötete Sporen unfähig zur Keimung sind, keimen frische Sporen sehr gut. Generell lässt sich vermuten, dass das freie NAD(P)H in den frischen Sporen sofort für den anschließend

folgenden Metabolismus benutzt werden kann. Entweder wird es im Entwicklungs-metabolismus zur Keimung oder im Überlebensmechanismus während der Lagerung eingesetzt. Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit ist, dass sich die WK Sporen entgegen der vorherigen Diskussion verhalten. Die WK Sporen haben während der Keimung mit vorausgegangener Lagerung einen genauso großen Fluoreszenzanteil an gebundenem NAD(P)H wie während der Keimung der frisch geernteten Sporen. Da die unterschiedlichen Agarplatten mit dem gleichen Strang von *Aspergillus Ochraceus* geimpft wurden, muss dieser Unterschied von den Nährböden stammen. Die Sporen sind also in der Lage sich an ihre Umwelt anzupassen. Zusätzlich liegt die Vermutung nahe, dass sie ein anderes Ensemble an Enzymen ausbilden und dass sich ihre Metabolitsubstanzen je nach Herkunft unterscheiden. Untermauert werden diese Vermutungen durch die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern des NAD(P)Hs und deren Anteile an der Gesamtfluoreszenz, welche in dieser Arbeit bestimmt wurden.

Zukünftige Messungen könnten die absolute Konzentration von NAD(P)H fokussieren. Dadurch könnten die Sporen weiter charakterisiert werden. Es gibt bereits Beispiele, bei denen die absolute Konzentration von NAD(P)H in Zellen mikroskopisch bestimmt wurde, um zwischen Krebszellen und normalen Zellen zu unterscheiden^[45]. Es ist durchaus denkbar eine Art mikroskopisches Testverfahren zu entwickeln, mit dem Sporen schnell auf ihre NAD(P)H Konzentration untersucht werden könnten, um die Aktivität ihres Metabolismus zu bestimmen. Das größte Problem absoluter Konzentrationsmessungen liegt in der genauen Bestimmung des Zweiphotonenabsorptionsquerschnitts. Da es gegenwärtig keine Verfahren gibt, die aufgrund der geringen Intensitätsänderungen in der Lage sind, die Zweiphotonenabsorption absolut zu messen, können Zweiphotonenabsorptionsquerschnitte nur mit Fluoreszenzverfahren bestimmt werden. Dabei gibt es in der Literatur zum Teil große Abweichungen in den publizierten Werten (> 50 %, Rhodamin 6G)^[63, 64]. Insofern bleibt die konzentrationsunabhängige Fluoreszenzlebensdauer eine der wichtigsten Größen in der modernen Spektroskopie und Mikroskopie.

Weitere zukünftige Messungen könnten sich mit dem Keimungsprozess der Sporen beschäftigen. In dieser Arbeit wurden stichprobenhaft Sporen untersucht, welche zwölf Stunden in einem Nährmedium gekeimt sind. Es wurde eine deutliche Ausbildung von Keimschläuchen beobachtet. Desweiteren konnte festgestellt werden, dass auch in den Keimschläuchen keine gleichmäßige Verteilung von NAD(P)H vorlag. Diese Messungen könnten die Grundlage für Messungen in einem flachen, lichtdurchlässigen Mikroreaktor

bilden. Dadurch wäre es anhand von Zeitrafferaufnahmen möglich, den Keimungsprozess mit Hilfe von NAD(P)H als Biomarker zu verfolgen. Interessant wäre es zu beobachten wie sich das enzymgebundene NAD(P)H während des Wachstums bewegt, da dies einen Hinweis auf die Bewegung der Enzyme geben würde, welche NAD(P)H binden können. Hilfreich wäre auch eine Identifizierung der NAD(P)H bindenden Enzyme.

5.2 Polarisationsmessungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein typischer Aufbau zur Zweifarben-Zweiphotonenanregung benutzt, um die molekularen Parameter von DMQ, Indol, Tryptophan und einigen Tryptophanderivaten zu bestimmen. Die Strahlenführung und Justierung wurden vereinfacht und verbessert. Im Vergleich zu anderen Aufbauten^[7] werden beide Strahlen erst in der Probe überlagert, was das Problem der chromatischen Abberation beseitigt. Desweiteren findet keine Depolarisation von zirkular polarisiertem Licht durch den Einsatz von dichroitischen Spiegeln statt. Die Justierung wurde durch zwei frei einstellbare Objektive und den permanenten Einbau einer ICCD-Kamera vereinfacht. Einen weiteren Vorteil bringt der Einsatz eines neuen Ti:Sa-Lasers, welcher einen Wellenlängenbereich von 700 bis 1000 nm abdeckt.

Der Aufbau sowie die Theorie der M-Parameter nach Vasyutinskii konnten mit Hilfe von Messungen an DMQ getestet und verifiziert werden. Durch Anregung des DMQ-Moleküls, gelöst in einer Cyclohexan/Parafin-Mischung, mit verschiedenen Polarisationen konnte ein Set von sieben M-Parametern bestimmt und daraus der Zweiphotonenabsorptionstensor berechnet werden. Desweiteren wurden die Fluoreszenzlebensdauer mit 753 ps und die Rotationskorrelationszeit mit 725 ps bestimmt und diese zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit der Literatur. Es konnte gezeigt werden, dass die Zweiphotonenanregung in diesem Fall bevorzugt (93 %) über die d_zd_z -Komponenten des Übergangsdipolmomentes des DMQs stattfindet. Dies entspricht der langen Molekülachse Z und bedeutet, dass eine Zweiphotonenanregung bevorzugt parallel zu dieser stattfindet. Allerdings findet auch eine Beteiligung der d_xd_z - und d_yd_z -Komponenten statt, auch wenn deren Beteiligung nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit auftritt. Weitere Messungen an DMQ wurden in Hexan durchgeführt, um den Einfluss der Viskosität des Lösungsmittels auf die Anisotropie zu testen. Wie erwartet reduzierte sich die Rotationskorrelationszeit auf 126 ps während die Fluoreszenzlebensdauer nahezu unverändert blieb. Die M-Parameter zeigten

ebenfalls eine signifikante Änderung. Das Ergebnis der Analyse des Zweiphotonenabsorptionstensors ergab, dass die Anregung in Hexan nur noch zu 83 % über die $d_z d_z$ -Komponenten des Übergangsdipolmomentes des DMQs stattfindet und somit der Einfluss der $d_x d_z$ - und $d_y d_z$ -Komponenten mit verringerter Viskosität des Lösungsmittels zunimmt. Als Konsequenz daraus ist es sinnvoll Lösungsmittel mit einer hohen Viskosität für Anisotropiemessungen zu verwenden, um störende Einflüsse der Diffusion zu vermeiden, selbst wenn hoch zeitaufgelöste Verfahren benutzt werden.

Daran anschließend wurden die Polarisationsmessungen auf biologisch relevante Moleküle erweitert. Zum ersten Mal konnten Indol, Tryptophan und weitere Tryptophanderivate, gelöst in Propylenglykol, mit Hilfe eines Femtosekundenlasers im Wellenlängenbereich von 280 nm bis 300 nm untersucht werden. Zunächst wurden die Fluoreszenzlebensdauer (3,77 ns) und Rotationskorrelationszeit (0,73 ns) bestimmt. Dabei konnte keine signifikante Korrelation durch Veränderung der Anregungswellenlänge festgestellt werden. Desweiteren kommt es zu einer Diskrepanz mit der Literatur (4,61 ns und 2,07 ns)^[60]. Da die einzigen Literaturwerte jedoch bei niedrigeren Temperaturen (5° C) und in der Frequenzdomäne gemessen wurden, sind Abweichungen durchaus denkbar. Darauf folgend wurden die Anisotropie und der Polarisationsgrad in Abhängigkeit von der Anregungswelle dargestellt. Hier konnte eine prinzipiell gute Übereinstimmung der Daten mit der Literatur festgestellt werden^[57, 60]. Anschließend wurden die M-Parameter aus den Daten berechnet und vorgestellt. Besonders interessant ist der Bereich bei 288 nm, da dort der L_a und L_b Zustand des Indols überlagern. Dies spiegeln auch die M-Parameter wider. Während in den Bereichen um 268 nm – 287 nm und 289 nm – 293 nm der L_a Zustand dominiert und dem Parameter $M_2(1,2)$ aufgrund seiner großen Abweichungen ein Wert von Null zugeschrieben wird, nimmt dieser Parameter bei 288 nm einen tatsächlichen Wert von 0,18 an, was allein auf den L_b Zustand zurückzuführen ist. Dieser Wert deutet darauf hin, dass für den L_b Zustand, im Gegensatz zum L_a Zustand, kein symmetrischer Zweiphotonenabsorptionstensor zu erwarten ist. Weitere signifikante Änderungen bei 288 nm konnten für die Parameter $M_2(0,2)$ und $M_2(2,2)$ beobachtet werden. Dies ist gleichzeitig ein weiterer Beweis dafür, dass der L_b Zustand energetisch sehr scharf ist und von dem energetisch sehr breitem L_a Zustand bei 288 nm überdeckt wird.

Zukünftige Messungen könnten zusätzlich den Einfluss des Lösungsmittels auf die M-Parameter klären. Catalán und Mitarbeiter berichteten, dass verschiedene Lösungsmittel sogar eine Inversion des L_a und L_b Zustandes hervorrufen können^[65]. Besonders unpolare Lösungsmittel wären von großem Interesse. Die technische Schwierigkeit besteht dann bei der

Detektion der Fluoreszenz, da Indol eine sehr starke Solvatochromie aufweist. Dadurch wird die Fluoreszenz bei der Verwendung von unpolaren Lösungsmitteln stark in Richtung niedriger Wellenlängen verschoben, die mit den verwendeten Detektoren nicht ausreichend stark detektiert werden können. Der Einsatz von Multichannelplatten würde sich an dieser Stelle allerdings nicht lohnen, da diese nur eine schlechte Zeitauflösung bieten und dadurch viele Prozesse nicht beobachtet werden können. In den letzten Jahren wurde die Forschung an neuartigen Hybriddetektoren vorangetrieben, welche eine Lösung bieten könnten.

Ziel der Messungen an L-Tryptophan, D-Tryptophan, Boc-Trp-OH und NATA war es, ein Set an M-Parametern zu bestimmen und untereinander zu vergleichen. Damit soll der Weg für zukünftige Messungen an komplexen Molekülen, wie zum Beispiel Proteinen geebnet werden. Da L- und D-Tryptophan sowie Boc-Trp-OH zwei Fluoreszenzlebensdauern besitzen, musste eine neue Methode zur Bestimmung dieser entwickelt werden. Die einfachste Methode wäre einen triexponentiellen Fit zu verwenden, jedoch sind dazu sehr hohe Fluoreszenzintensitäten nötig. Ein triexponentieller Fit wurde bei den Sporenmessungen erfolgreich eingesetzt, wo durch den Einsatz eines Objektivs mit einer NA von 1,3 sehr hohe Intensitäten erreicht werden konnten. Bei Polarisationsmessungen muss auf hohe Numerische Aperturen verzichtet werden, da sie zur Depolarisation von zirkularer Strahlung führen. Nichtsdestotrotz konnte eine neue Methode entwickelt werden. Dazu wurde zunächst die Gesamtintensität aus den Anisotropiekurven berechnet, was zur Auslöschung der Anisotropie führt. Die so erhaltene Abklingkurve konnte biexponentiell behandelt werden, um die Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen. Anschließend konnten die Fluoreszenzlebensdauern als konstante Größen in einem triexponentiellen Fit vorgegeben werden, so dass nur die Rotationskorrelationszeit und die Anisotropie bestimmt werden musste. NATA besitzt nach den vorliegenden Ergebnissen nur eine Fluoreszenzlebensdauer und bildet damit eine Ausnahme. Es liegt die Vermutung nahe, dass falls NATA tatsächlich zwei Fluoreszenzlebensdauern besitzt, eine der beiden sehr kurz ist und damit in den Bereich der Apparatefunktion fällt.

Alle Proben wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm untersucht. Ein Vergleich der Daten der Proben zeigte nur kleine Abweichungen bei den jeweiligen Parametern, wie der ersten Fluoreszenzlebensdauer, der Anisotropie und des Polarisationsgrades. Dies war zu erwarten, da die Chromophore Einheit in allen Substanzen die Indolylgruppe ist. Eine interessante Abweichung ergab der Vergleich der zweiten Fluoreszenzlebensdauer der Tryptophandistereomere. So konnte ein Unterschied rund 300 ps ermittelt werden. Warum

die L-Form eine kürzere zweite Fluoreszenzlebensdauer aufweist konnte nicht geklärt werden. Weitere Abweichungen, welche erwartet wurden, zeigt der Vergleich der Rotationskorrelationszeiten. Die beiden Tryptophandistereomere weisen die längsten Rotationskorrelationszeiten auf, während Indol die kürzeste besitzt. Im Fall von Indol, Boc-Trp-OH und NATA ist dieser Trend schnell durch den Einfluss der Molekülgröße erklärt. Bei den beiden Tryptophandistereomere deuten die Daten auf eine Besonderheit hin: die Ausbildung von Dimeren, durch welche die Molekülgröße verdoppelt wird und sich die Daten erklären lassen. Messungen mit Veränderung der Konzentration waren nicht Bestandteil dieser Arbeit, könnten aber zukünftig zur genauen Klärung dieses Sachverhalts dienlich sein. Messungen mit Veränderung der Anregungswellenlänge im Bereich von 280 bis 288 nm wurden stichprobenhaft für L-Tryptophan und NATA durchgeführt. Die einzige Auffälligkeit ist die länger werdende zweite Fluoreszenzlebensdauer des L-Tryptophans mit abnehmender Anregungsenergie. Alle weiteren Parameter veränderten sich innerhalb der Fehlergrenzen nicht oder nur vernachlässigbar klein.

Die Analyse der M-Parameter wurde für alle Proben durchgeführt und gegenübergestellt. Die M-Parameter für L- und D-Tryptophan sowie NATA sind sich sehr ähnlich und deuten insgesamt auf einen nichtsymmetrischen Zweiphotonentensor hin. Interessant ist der Fakt, dass Boc-Trp-OH und Indol sehr ähnliche M-Parameter aufweisen. Zusätzlich deuten diese bei einer Anregung bei 280 nm auf einen totalsymmetrischen Übergang hin, da für $M_0(1,1)$, $M_2(1,1)$ und $M_2(1,2)$ in diesen Fällen ein Wert von Null angenommen werden kann. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Funktionalisierung des Indolmoleküls die Symmetrie des Zweiphotonenabsorptionstensors zerstört. Interessant ist aber, dass die Funktionalisierung der Carboxylgruppe des Tryptophans mit der Butoxycarbonylfunktion die Symmetrie des Zweiphotonenabsorptionstensors wieder herstellt.

Insgesamt wurde damit auch bei den Polarisationsmessungen das Ziel dieser Arbeit erreicht und die Grundlage für kommende Untersuchungen an Proteinen, welche Tryptophan enthalten, geschaffen. Ein interessantes Forschungsobjekt könnte die Denaturierung eines tryptophanreichen Proteins sein, da sich während des Abbaus des Proteins die Umgebung der Tryptophangruppen ständig ändert und sich diese Änderung in den M-Parametern widerspiegeln wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Göppert-Mayer, M., *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*. 1930: Göttingen.
2. Kaiser, W. and C.G.B. Garrett, *Two-Photon Excitation in CaF₂Eu²⁺*. Physical Review Letters, 1961. **7**(6): p. 229-231.
3. McClain, W.M., *Two-photon molecular spectroscopy*. Accounts of Chemical Research, 1974. **7**(5): p. 129-135.
4. Callis, P.R., J. Chem. Phys., 1993. **99**: p. 27.
5. Wan, C. and C.K. Johnson, *Time-resolved anisotropic two-photon spectroscopy*. Chemical Physics, 1994. **179**(3): p. 513-531.
6. Shternin, P.S., K.H. Gericke, and O.S. Vasyutinskii, Mol. Phys., 2010. **108**: p. 813.
7. Denicke, S., et al., *Dynamics of Two-Color Two-Photon Excited Fluorescence of p-Terphenyl: Determination and Analysis of the Molecular Parameters[†]*. The Journal of Physical Chemistry A, 2010. **114**(36): p. 9681-9692.
8. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat Biotech, 2003. **21**(11): p. 1369-1377.
9. Stryer, L., *Biochemistry*. 5. ed. 2002, New York: W.H. Freeman and Company.
10. Ying, W., *NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences*. Antioxidants & redox signaling, 2008. **10**(2): p. 179-206.
11. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006.
12. Baker, N.R., *Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo*. Annual Review of Plant Biology, 2008. **59**(1): p. 89-113.
13. Imanishi, Y., K.H. Lodowski, and Y. Koutalos, *Two-Photon Microscopy: Shedding Light on the Chemistry of Vision[†]*. Biochemistry, 2007. **46**(34): p. 9674-9684.
14. Meredith, P. and T. Sarna, *The physical and chemical properties of eumelanin*. Pigment Cell Research, 2006. **19**(6): p. 572-594.
15. Durrell, L.W., *The composition and structure of walls of dark fungus spores*. Mycopathologia et mycologia applicata, 1964. **23**(4): p. 339-345.
16. Bell, A.A. and M.H. Wheeler, *Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins*. Annual Review of Phytopathology, 1986. **24**(1): p. 411-451.
17. Tran, M.L., B.J. Powell, and P. Meredith, *Chemical and Structural Disorder in Eumelanins: A Possible Explanation for Broadband Absorbance*. Biophysical Journal, 2006. **90**(3): p. 743-752.
18. Lakowicz, J.R., et al., *Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(4): p. 1271-1275.
19. Niesner, R., et al., *Selective Detection of NADPH Oxidase in Polymorphonuclear Cells by Means of NAD(P)H-Based Fluorescence Lifetime Imaging*. Journal of Biophysics, 2008. **2008**: p. 13.
20. Niesner, R., et al., *Noniterative Biexponential Fluorescence Lifetime Imaging in the Investigation of Cellular Metabolism by Means of NAD(P)H Autofluorescence*. ChemPhysChem, 2004. **5**(8): p. 1141-1149.
21. Cotton, F.A., *Chemical Application of Group Theory*. 3rd ed. 1990, New York: Wiley.
22. Dirac, P.A.M., *The Quantum Theory of Dispersion*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, 1927. **114**(769): p. 710-728.
23. Demtröder, W., *Laser Spectroscopy*. 1981, Springer: Berlin. p. 437.
24. Petricolas, W.L., *Multiphoton Spectroscopy*. Annual Review of Physical Chemistry, 1967. **18**(1): p. 233-260.
25. McClain, W.M., *Excited State Symmetry Assignment Through Polarized Two-Photon Absorption Studies of Fluids*. The Journal of Chemical Physics, 1971. **55**(6): p. 2789-2796.
26. McClain, W.M., J. Chem. Phys., 1972. **57**: p. 2264.
27. McClain, W.M., *Polarization of two-photon excited fluorescence*. The Journal of Chemical Physics, 1973. **58**(1): p. 324-326.

28. Wan, C. and C.K. Johnson, *Time-resolved two-photon induced anisotropy decay: The rotational diffusion regime*. The Journal of Chemical Physics, 1994. **101**(12): p. 10283-10291.
29. Gaisenk, V.A., *Laser spectroscopy of polarized absorption and luminescence of complex molecules (review)*. Journal of Applied Spectroscopy, 1988. **49**(5): p. 1087-1104.
30. Varshalovich, D.A., A.N. Moskalev, and V.K. Khersonskii, *Quantum Theory of Angular Momentum*. 1988, Singapore: World Scientific.
31. Niesner, R., et al., *3D-Resolved Investigation of the pH Gradient in Artificial Skin Constructs by Means of Fluorescence Lifetime Imaging*. Pharmaceutical Research, 2005. **22**(7): p. 1079-1087.
32. Xu, C. and W.W. Webb, *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. J. Opt. Soc. Am. B, 1996. **13**(3): p. 481-491.
33. Shribak, M., S. Inoue, and R. Oldenbourg, *Polarization aberrations caused by differential transmission and phase shift in high-numerical-aperture lenses: theory, measurement, and rectification*. Optical Engineering, 2002. **41**(5): p. 943-954.
34. Habenicht, A., et al., *Two-photon excitation and time-resolved fluorescence: I. The proper response function for analysing single-photon counting experiments*. Chemical Physics Letters, 2002. **354**(5-6): p. 367-375.
35. Zheltikov, A.M., *Let there be white light: supercontinuum generation by ultrashort laser pulses*. Physics-Uspekhi, 2006. **49**(6): p. 605.
36. PicoQuant. *Single Photon Avalanche Diodes*. March 2012; Available from: http://www.picoquant.com/datasheets/photon_counting/PDM_Series.pdf.
37. Favro, L.D., *Theory of the Rotational Brownian Motion of a Free Rigid Body*. Physical Review, 1960. **119**(1): p. 53-62.
38. Chuang, T.J. and K.B. Eisenthal, *Theory of Fluorescence Depolarization by Anisotropic Rotational Diffusion*. The Journal of Chemical Physics, 1972. **57**(12): p. 5094-5097.
39. Crutzen, M., et al., *Global analysis of unmatched polarized fluorescence decay curves*. The Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**(31): p. 8133-8145.
40. Forest, S.E., et al., *A Model for the Activated Energy Transfer within Eumelanin Aggregates*. The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(4): p. 811-814.
41. Ehlers, A., et al., *Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair*. Microscopy Research and Technique, 2007. **70**(2): p. 154-161.
42. Niesner, R., et al., *Selective Detection of NADPH Oxidase in Polymorphonuclear Cells by Means of NAD(P)H-Based Fluorescence Lifetime Imaging*. Journal of Biophysics, 2008. **2008**.
43. Rinnenthal, J.L., et al., *Selective Detection of NAD(P)H-Dependent Enzymes during Their Function within Vital Cells by means of Time-Resolved TPLSM*. Biophysical Journal, 2009. **96**(3, Supplement 1): p. 295a.
44. Zhang, Q., D.W. Piston, and R.H. Goodman, *Regulation of Corepressor Function by Nuclear NADH*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1895-1897.
45. Yu, Q. and A.A. Heikal, *Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular NADH concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009. **95**(1): p. 46-57.
46. Arcangeli, C., et al., *Two-photon autofluorescence microscopy and spectroscopy of Antarctic fungus: New approach for studying effects of UV-B irradiation*. Biopolymers, 2000. **57**(4): p. 218-225.
47. Vishwasrao, H.D., et al., *Conformational Dependence of Intracellular NADH on Metabolic State Revealed by Associated Fluorescence Anisotropy*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(26): p. 25119-25126.
48. Istratov, A.A. and O.F. Vyvenko, *Exponential analysis in physical phenomena*. Review of Scientific Instruments, 1999. **70**(2): p. 1233-1257.
49. Xia, W., et al., *Roles of NAD⁺ / NADH and NADP⁺ / NADPH in Cell Death*. Current Pharmaceutical Design, 2009. **15**(1): p. 12-19.

50. Vézina, C., S.N. Sehgal, and K. Singh, *Transformation of Steroids by Spores of Microorganisms: I. Hydroxylation of Progesterone by Conidia of Aspergillus ochraceus*. Applied Microbiology, 1963. **11**(1): p. 50-57.
51. Quentmeier, S., et al., *Two-Color Two-Photon Excitation Using Femtosecond Laser Pulses*. The Journal of Physical Chemistry B, 2008. **112**(18): p. 5768-5773.
52. Brackmann, U., *Laser-grad Dyes - Data Sheets*. 1st Edition ed. 1986, Göttingen.
53. Herbrich, S., et al., *Two-Color Two-Photon Excited Fluorescence of DMQ: Ab Initio Calculations and Experimental Determination of the Molecular Parameters*. to be published, 2013.
54. WEBER, G., *Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in tyrosine, tryptophan and related compounds*. Biochem. J., 1960. **75**: p. 335-345.
55. Platt, J.R., *Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons*. The Journal of Chemical Physics, 1949. **17**(5): p. 484-495.
56. Strickland, E.H., J. Horwitz, and C. Billups, *Near-ultraviolet absorption bands of tryptophan. Studies using indole and 3-methylindole as models*. Biochemistry, 1970. **9**(25): p. 4914-4921.
57. Anderson, B.E., et al., *Polarized two-photon fluorescence excitation spectra of indole and benzimidazole*. Chemical Physics Letters, 1986. **125**(2): p. 106-112.
58. Roy Meech, S., D. Phillips, and A.G. Lee, *On the nature of the fluorescent state of methylated indole derivatives*. Chemical Physics, 1983. **80**(3): p. 317-328.
59. Eftink, M.R., et al., *Photophysics of indole derivatives: experimental resolution of La and Lb transitions and comparison with theory*. The Journal of Physical Chemistry, 1990. **94**(9): p. 3469-3479.
60. Lakowicz, J.R., et al., *Anisotropy spectra of indole and N-acetyl-L-tryptophanamide observed for two-photon excitation of fluorescence*. Chemical Physics Letters, 1992. **194**(4-6): p. 282-287.
61. Gryczynski, I., H. Malak, and J.R. Lakowicz, *Two-color two-photon excitation of indole*. Biospectroscopy, 1997. **3**(2): p. 97-101.
62. Qiao, L., et al., *Two-color two-photon excitation of indole using a femtosecond laser regenerative amplifier*. Optics Communications, 2009. **282**(5): p. 1056-1061.
63. Kauert, M., et al., *Absolute measurement of molecular two-photon absorption cross-sections using a fluorescence saturation technique*. Optics Express, 2006. **14**(18): p. 8434-8447.
64. Makarov, N.S., M. Drobizhev, and A. Rebane, *Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range*. Optics Express, 2008. **16**(6): p. 4029-4047.
65. Catalán, J., et al., *First reported evidence that solvent polarity induces an 1Lb \leftrightarrow 1La inversion in the indole chromophore*. Chemical Physics Letters, 2003. **368**(5-6): p. 717-723.

7 Appendix

Auf den folgenden Seiten werden Beispiele die Fluoreszenzlebensdauerbilder gezeigt, welche zur Charakterisierung der Sporen von *Aspergillus* *Ochraceus* aufgenommen wurden. Zuerst werden die Bilder der Sporen gezeigt, welche 12 Stunden gekeimt wurden. Danach folgen Bilder der Sporen sortiert nach dem Nährboden auf dem sie gezüchtet wurden.

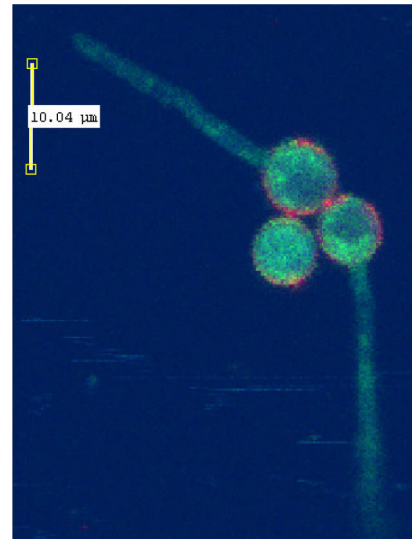
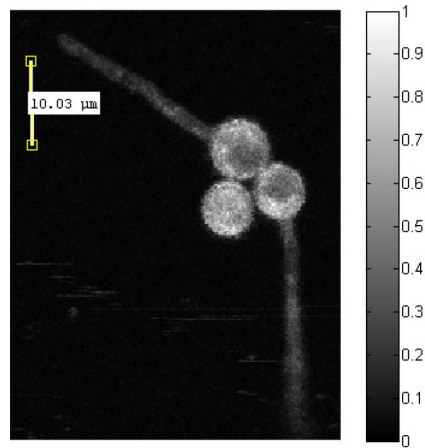
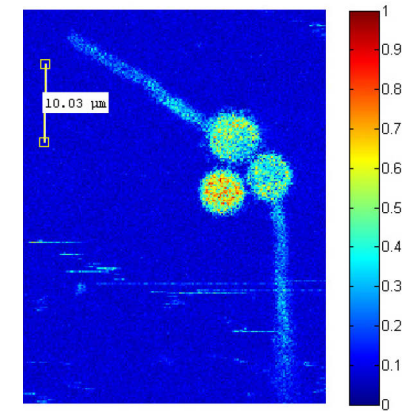
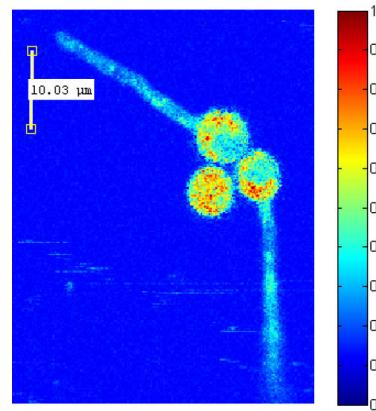
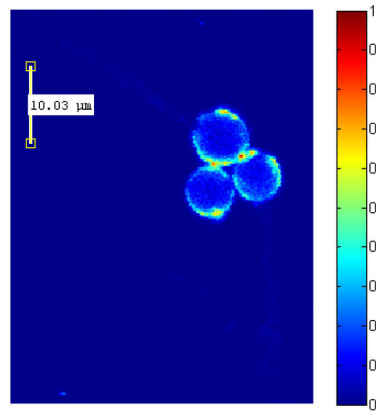


Abbildung 7.1: HK-Sporen mit ausgebildetem Keimschlauch nach 12 Stunden der Keimung; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).



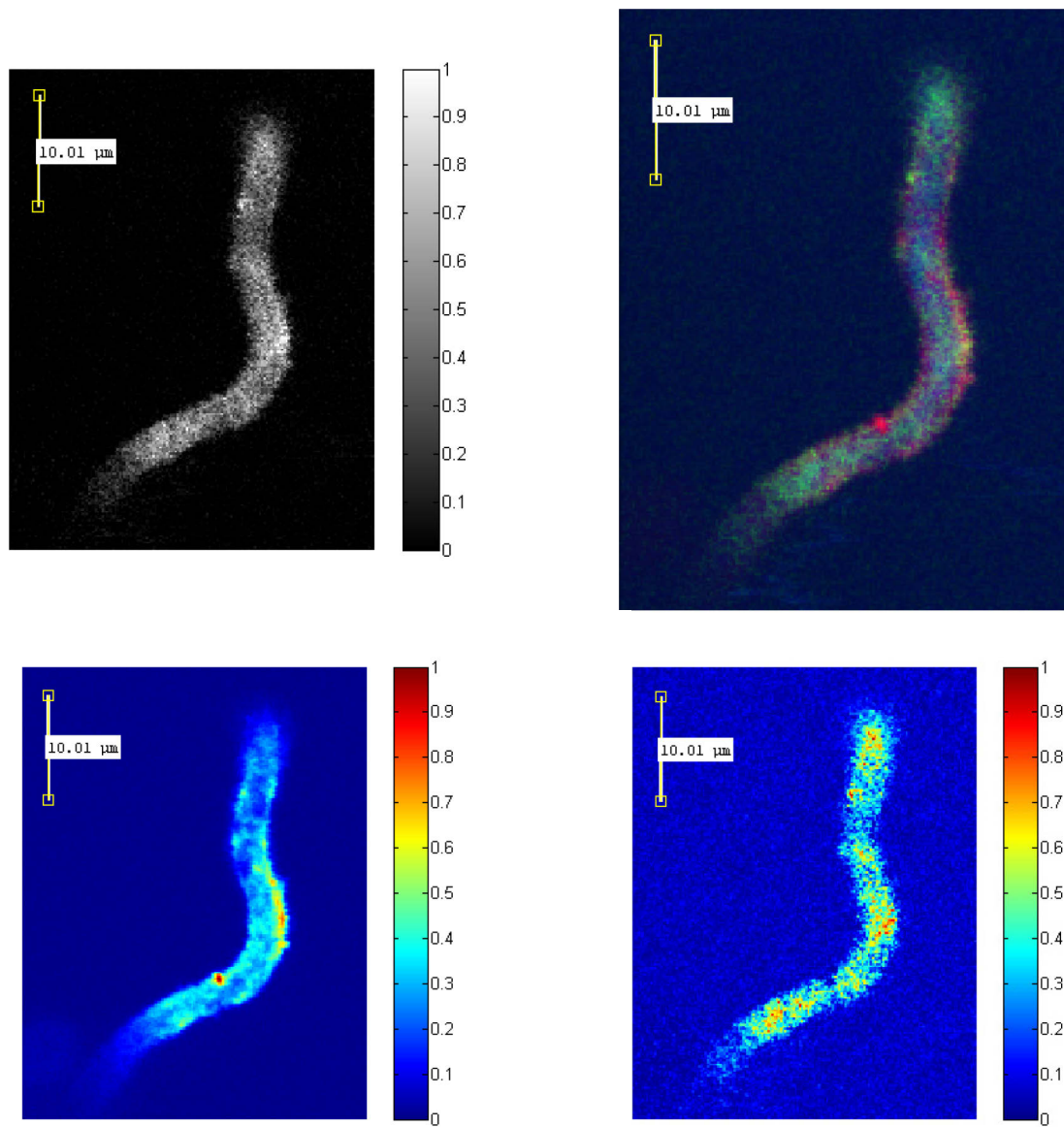


Abbildung 7.2: Keimschlauch einer MEA-Spore nach 12 Stunden der Keimung; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

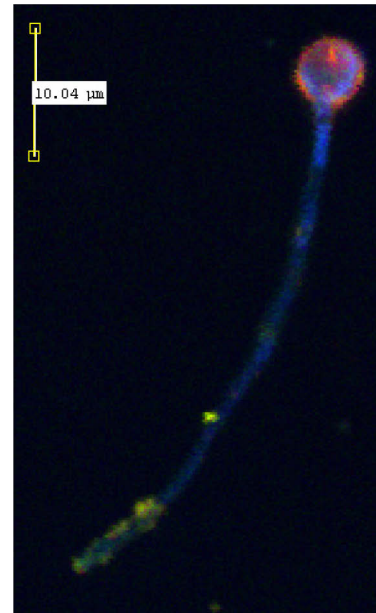
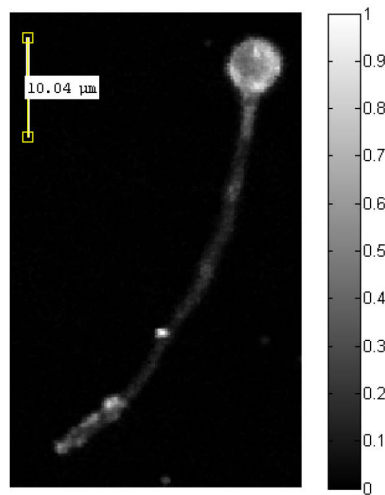
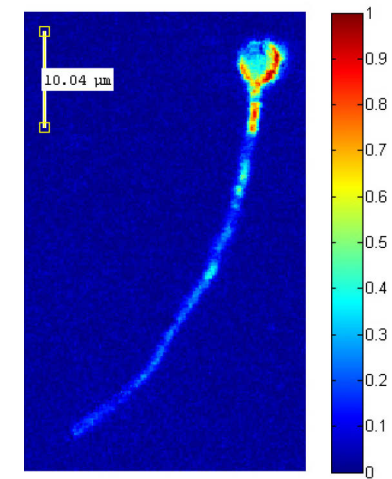
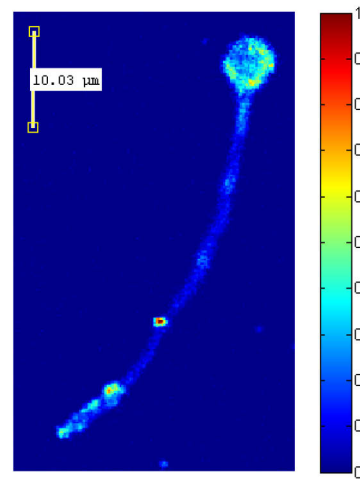
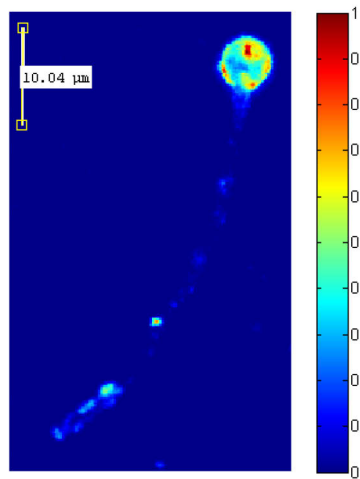


Abbildung 7.3: MEA-Spore mit ausgebildetem Keimschlauch nach 12 Stunden der Keimung; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).



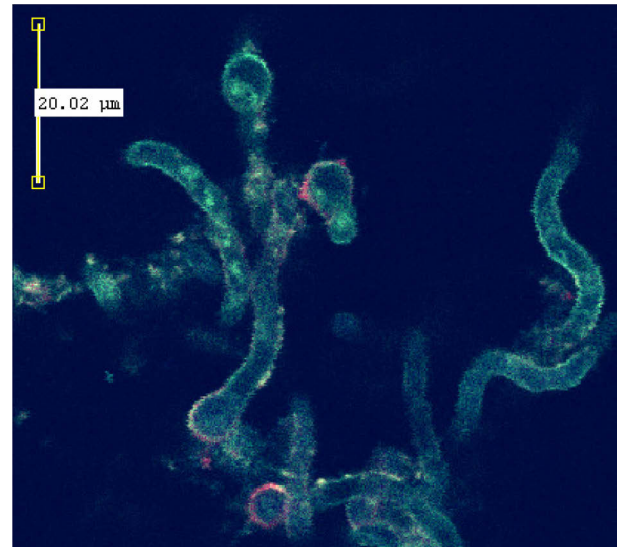
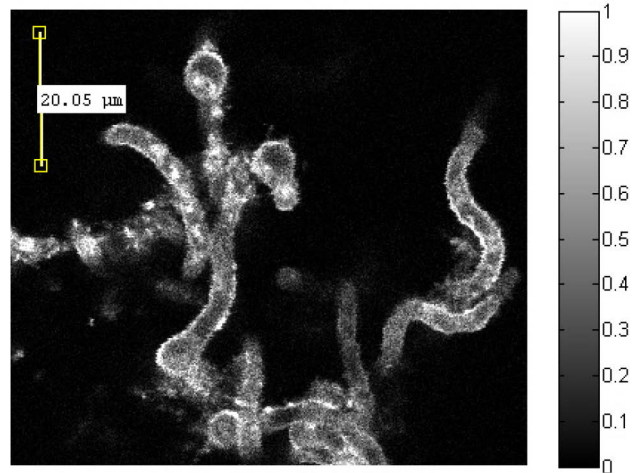
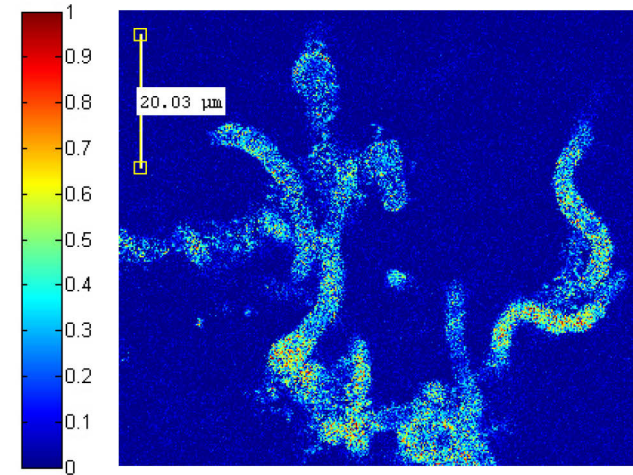
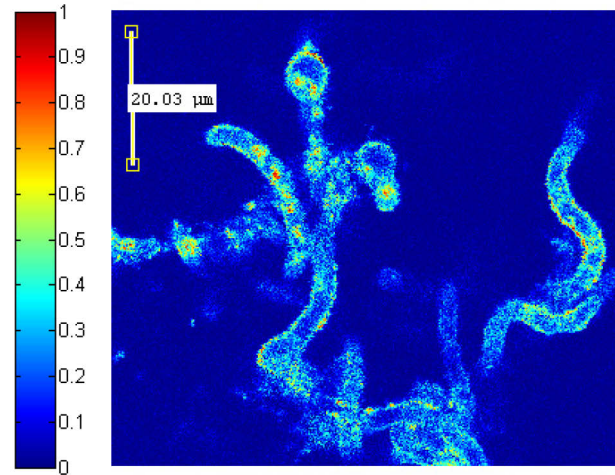
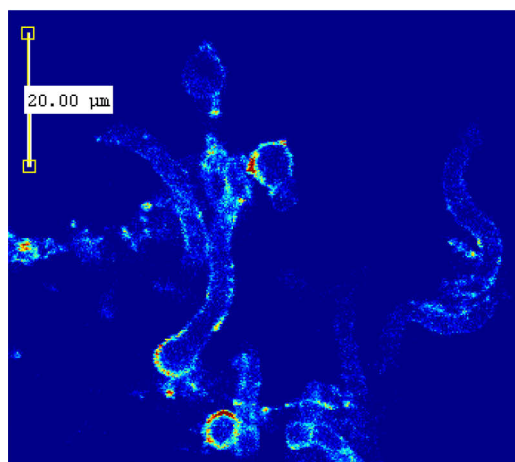


Abbildung 7.4: Ansammlung von WK-Sporen mit ausgebildeten Keimschläuchen nach 12 Stunden der Keimung; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).



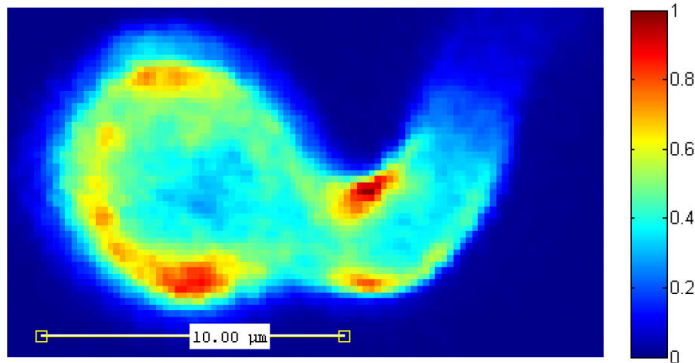
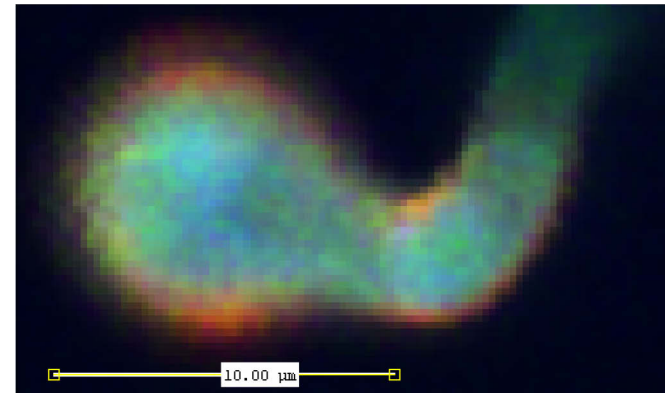
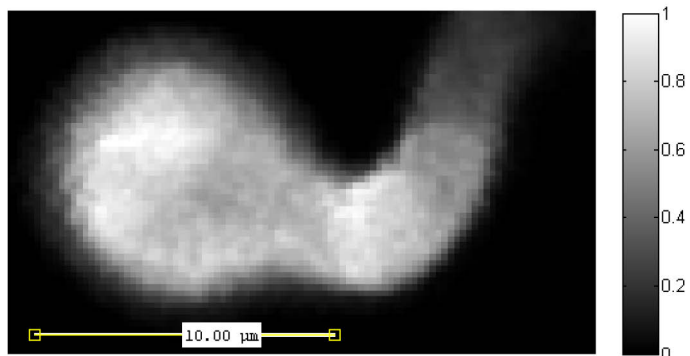
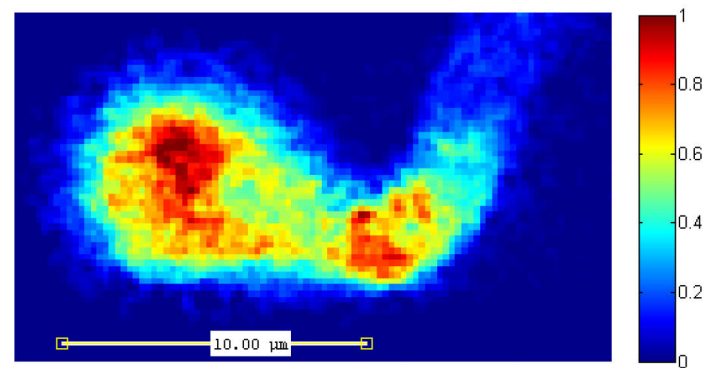
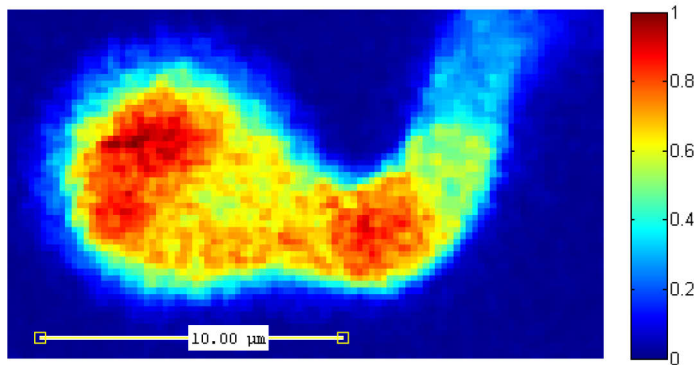


Abbildung 7.5: WK-Spore mit Keimschlauchansatz nach 12 Stunden der Keimung; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).



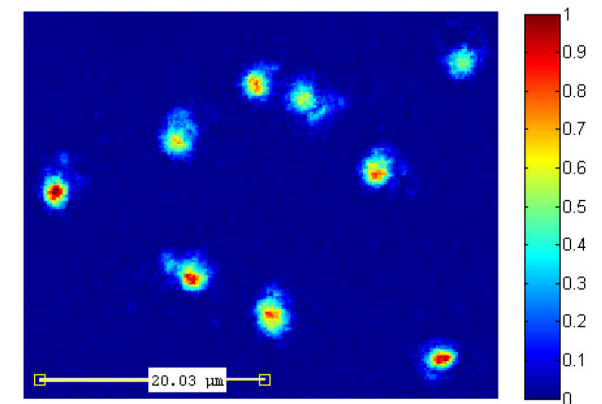
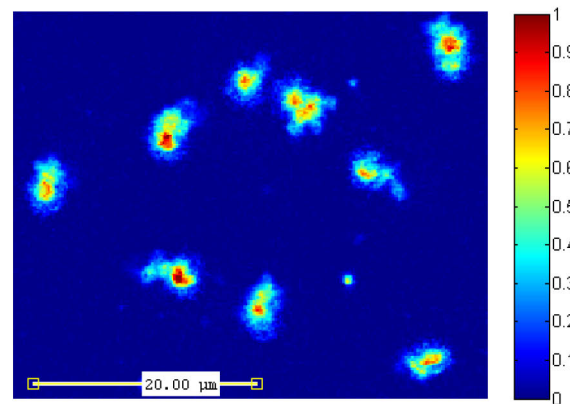
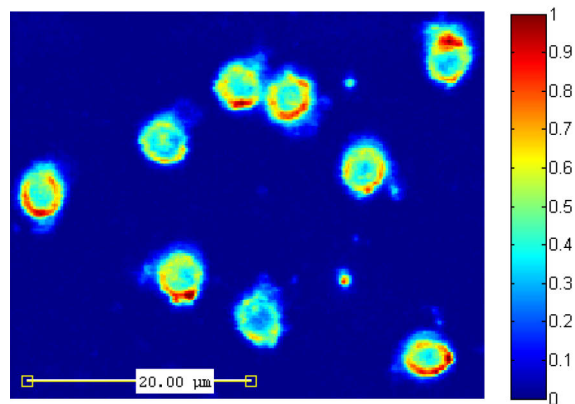
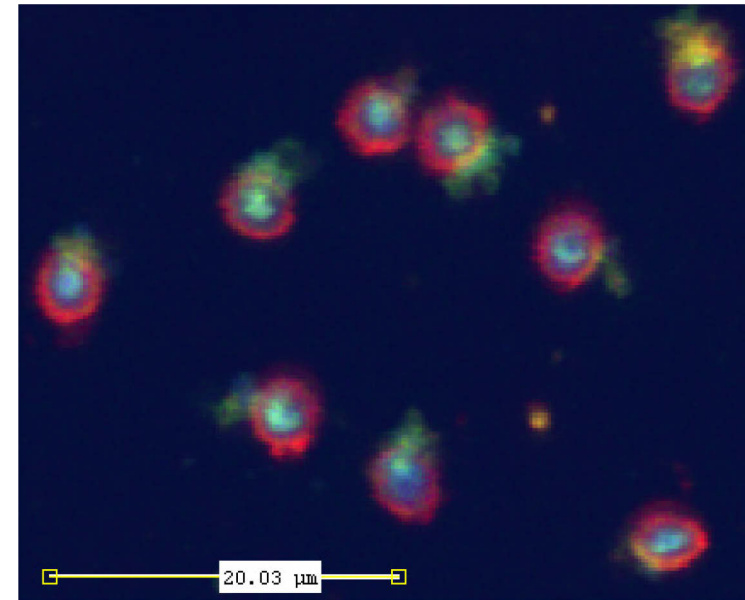
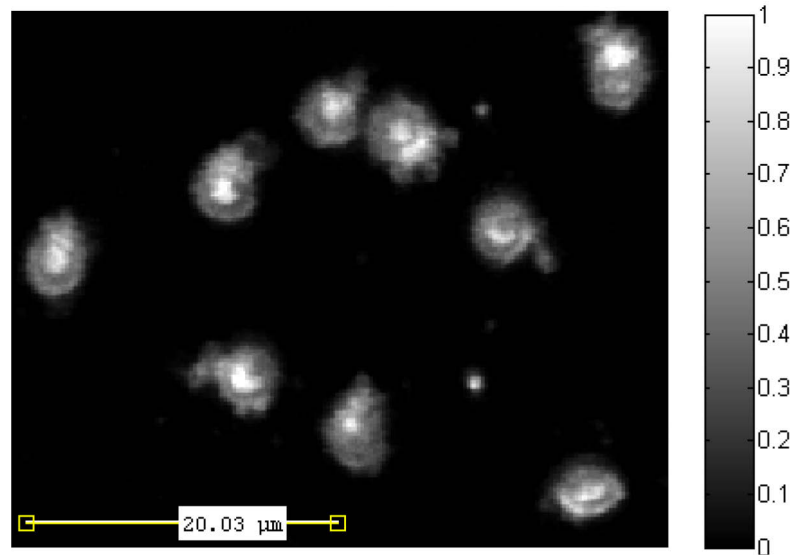


Abbildung 7.6: frisch geerntete-HK Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

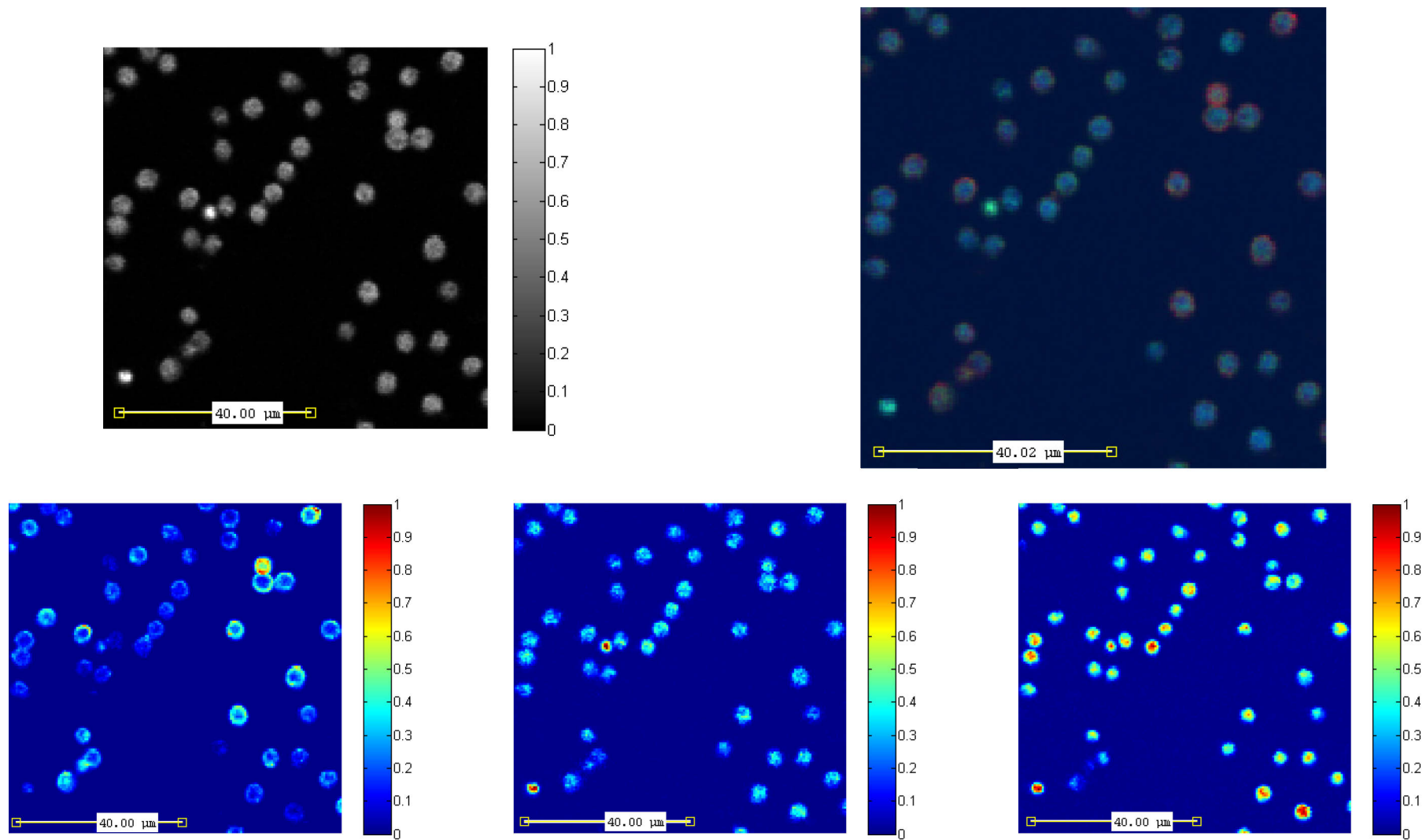


Abbildung 7.7: Zwei Wochen gelagerte HK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

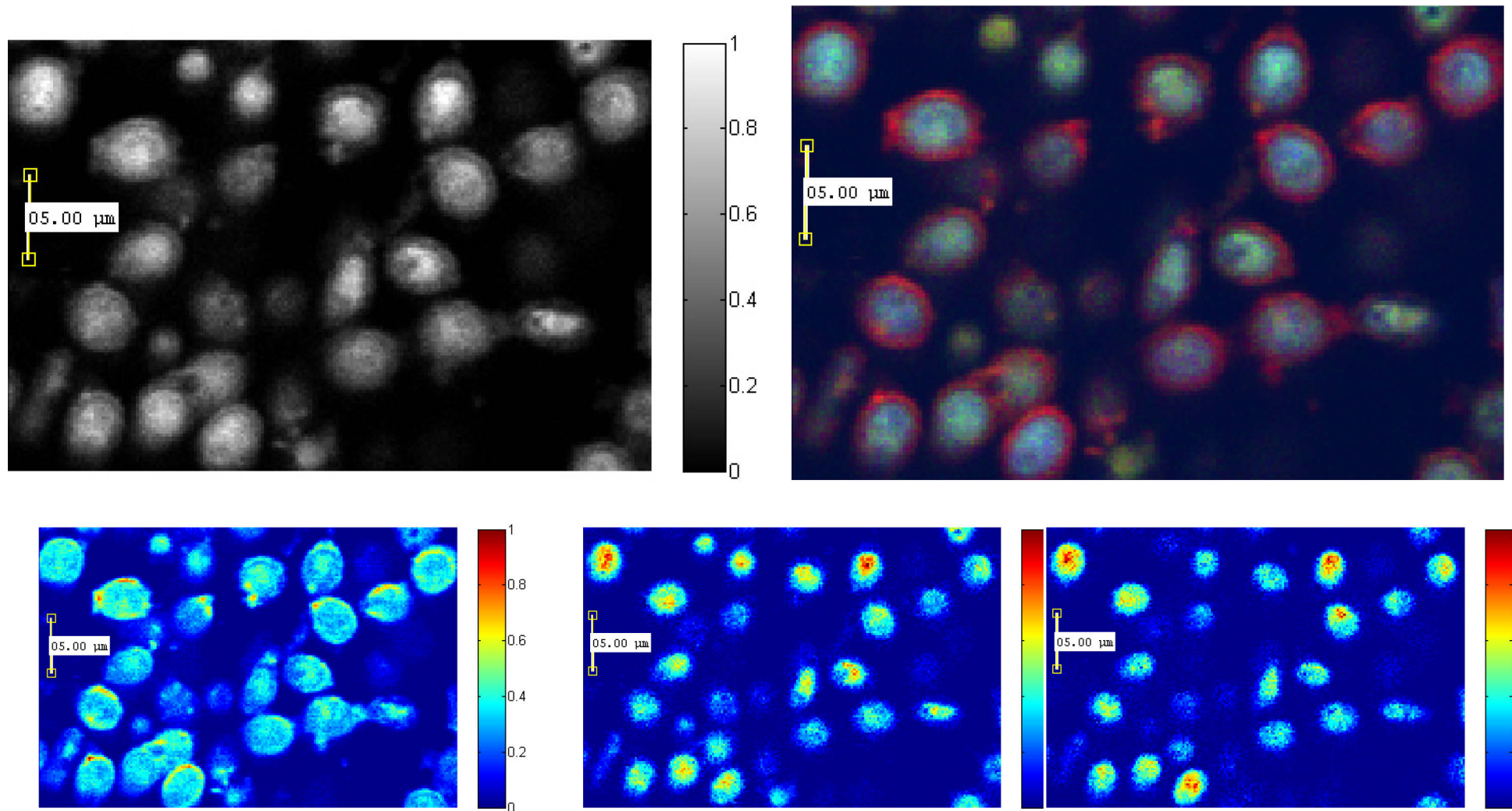


Abbildung 7.8: Abgetötete HK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

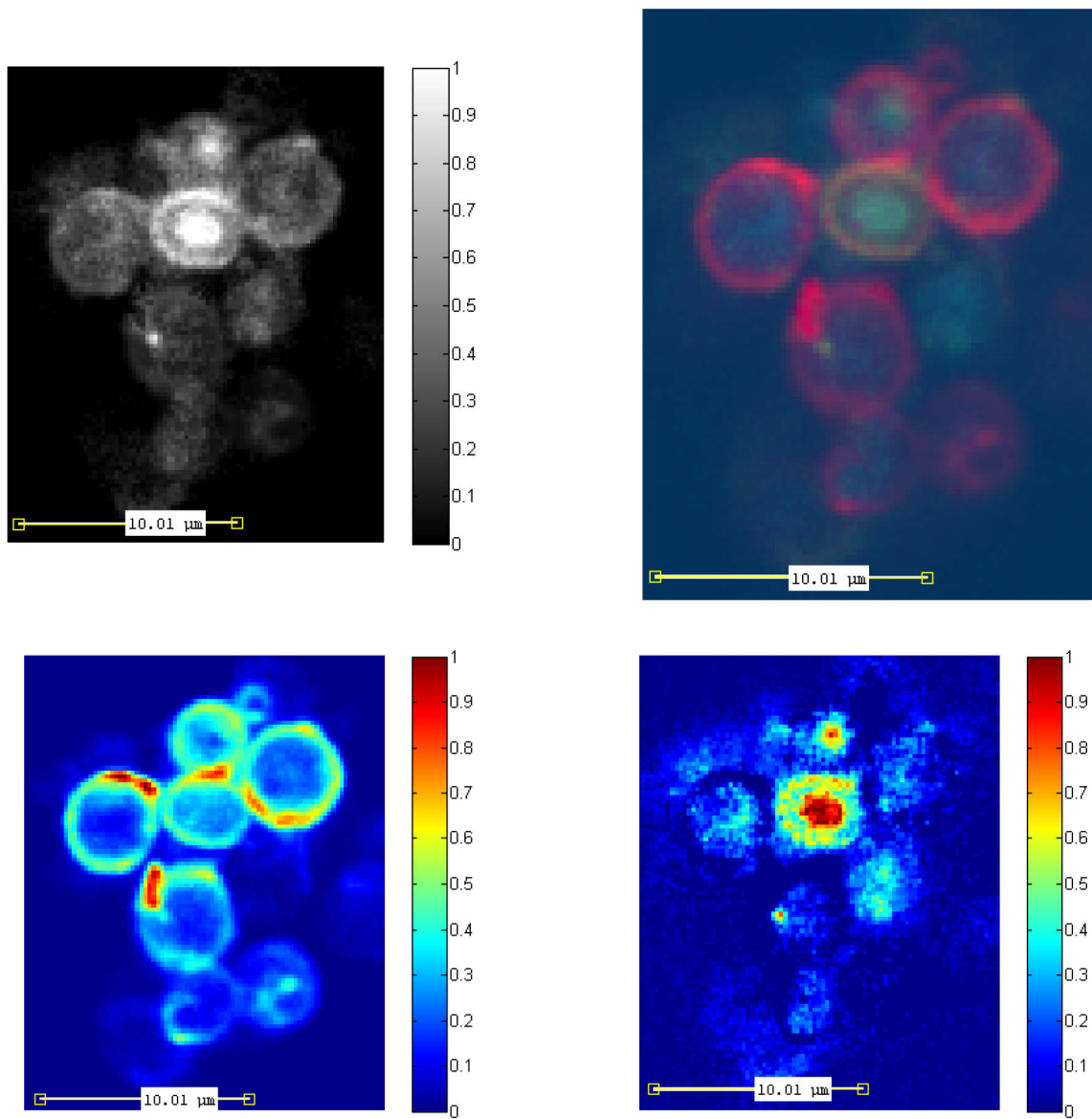


Abbildung 7.9: Frisch gekeimte HK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

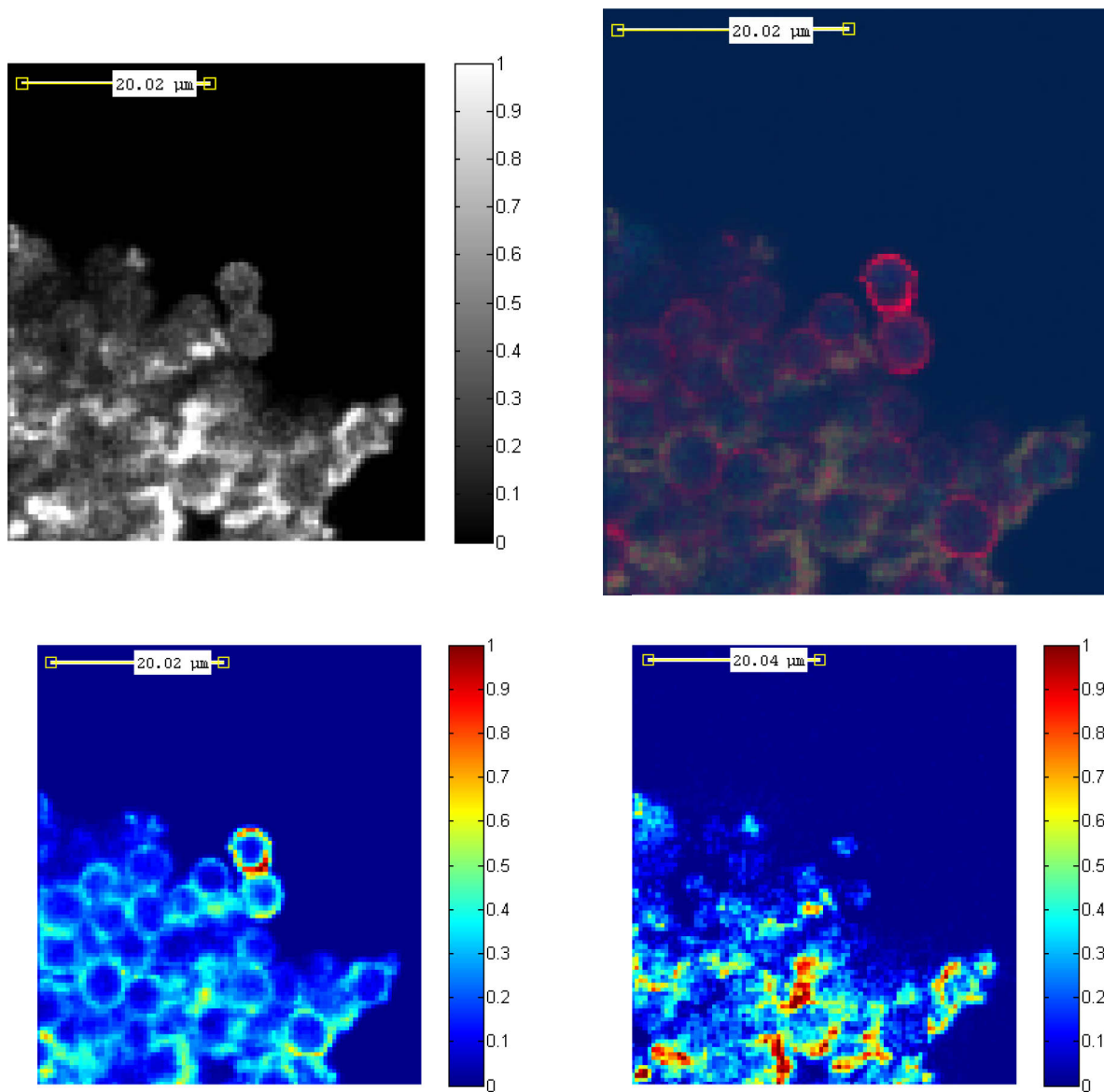


Abbildung 7.10: Zwei Wochen gelagert und anschließend gekeimte HK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

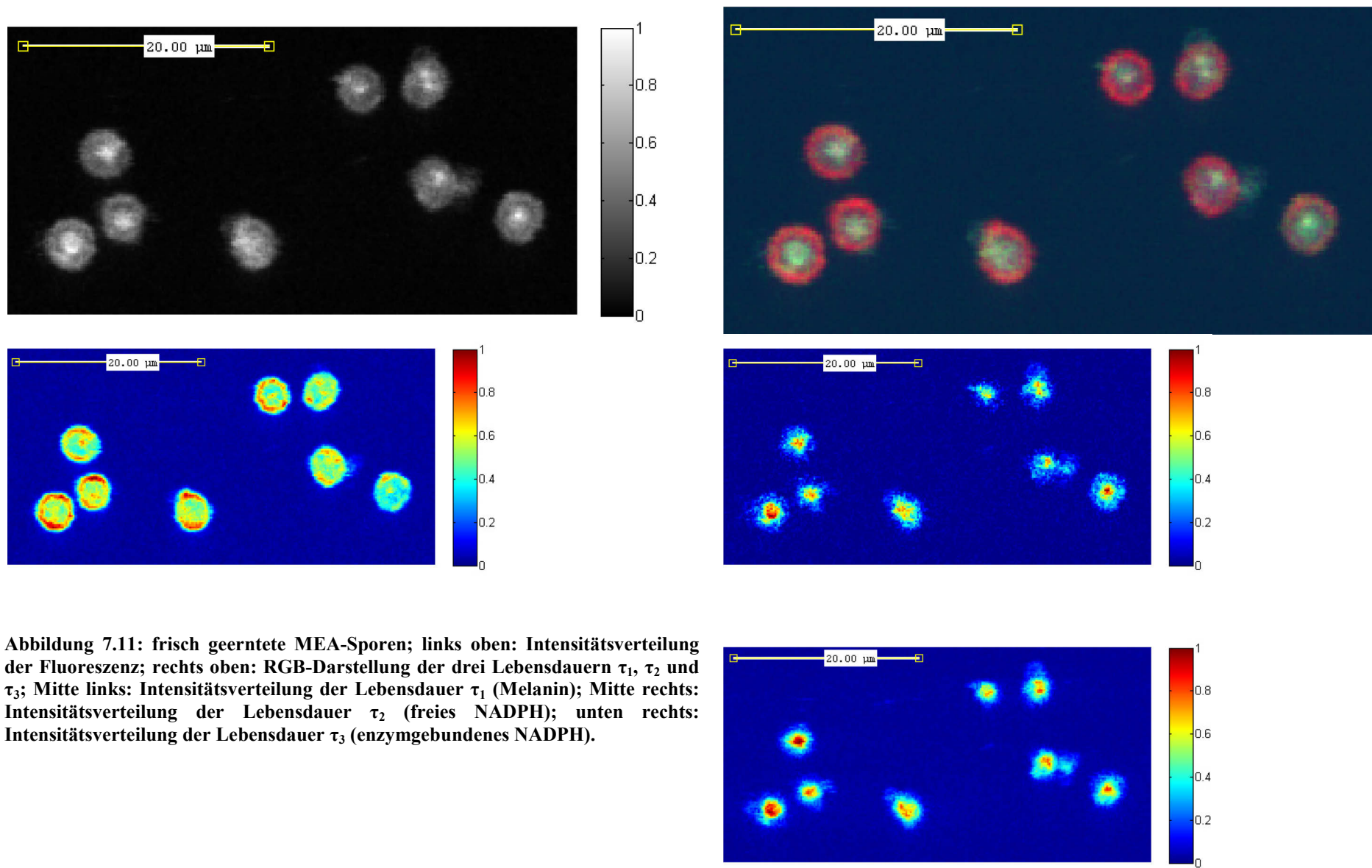


Abbildung 7.11: frisch geerntete MEA-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; Mitte links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); Mitte rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

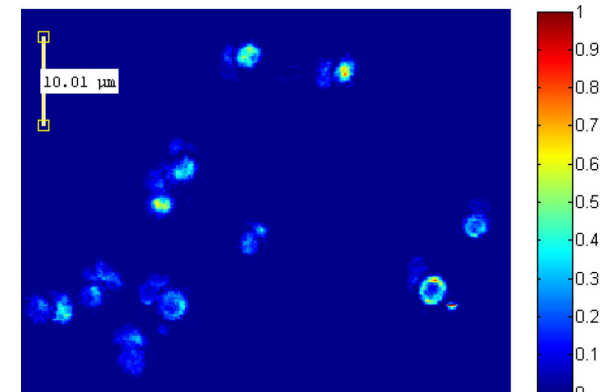
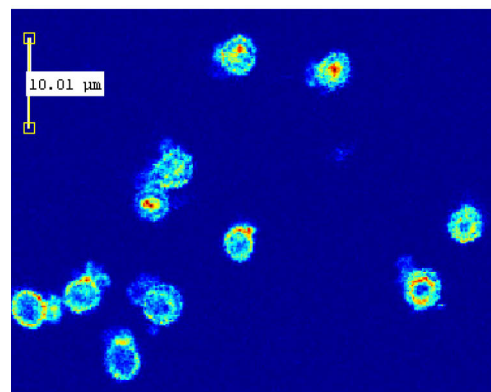
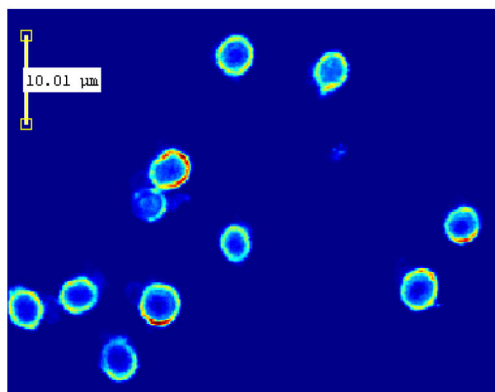
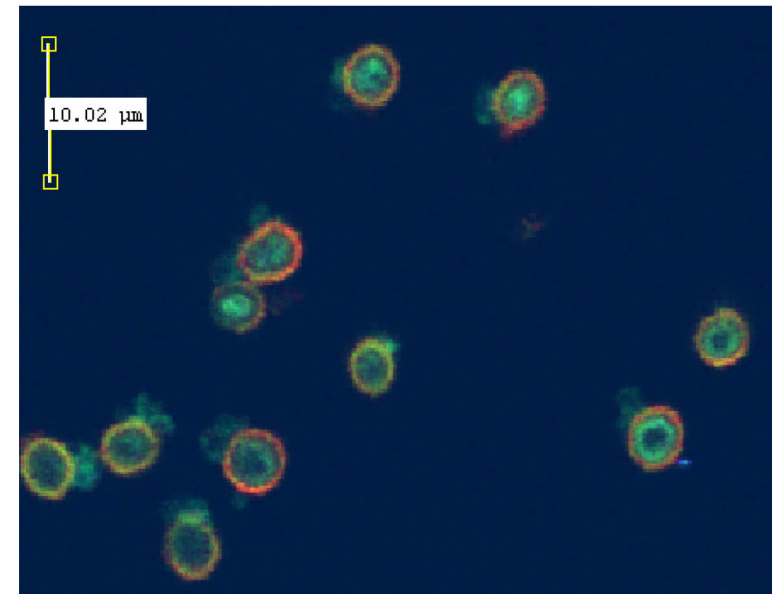
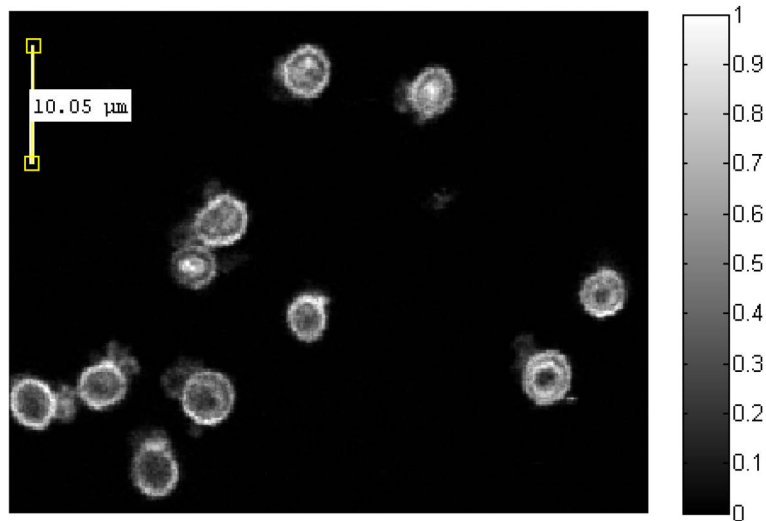


Abbildung 7.12: Zwei Wochen gelagerte MEA-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

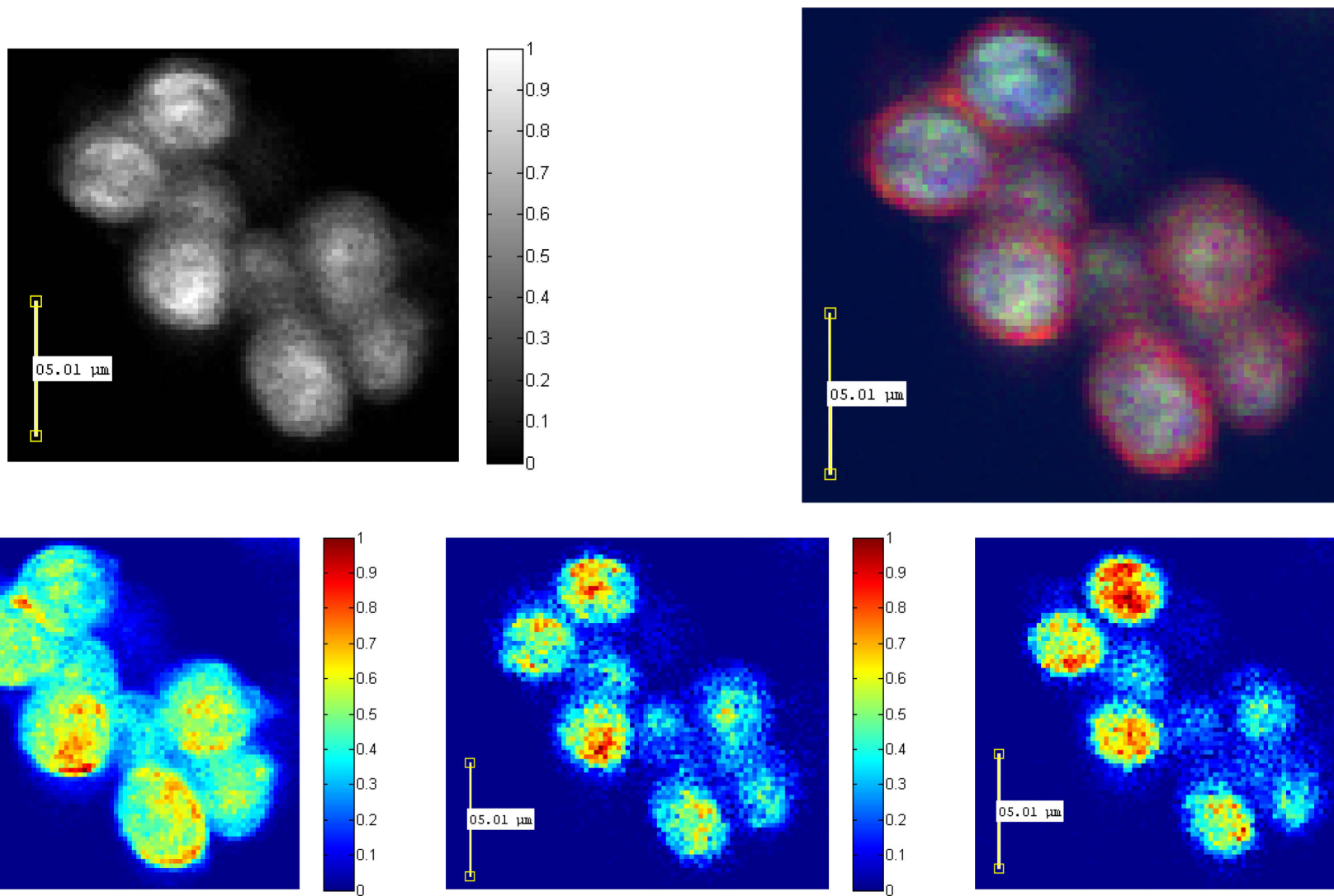


Abbildung 7.13: Abgetötete MEA-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

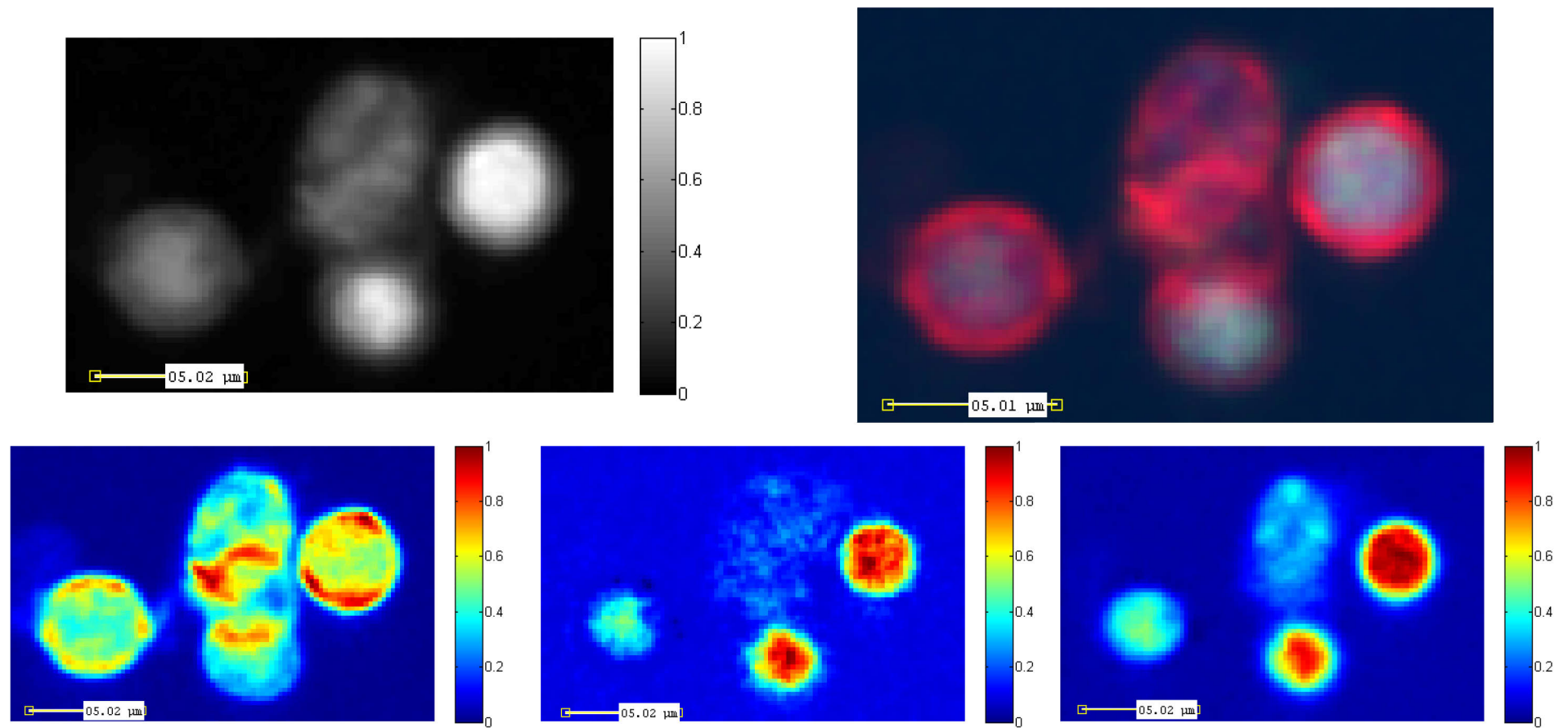


Abbildung 7.14: Frisch gekeimte MEA-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

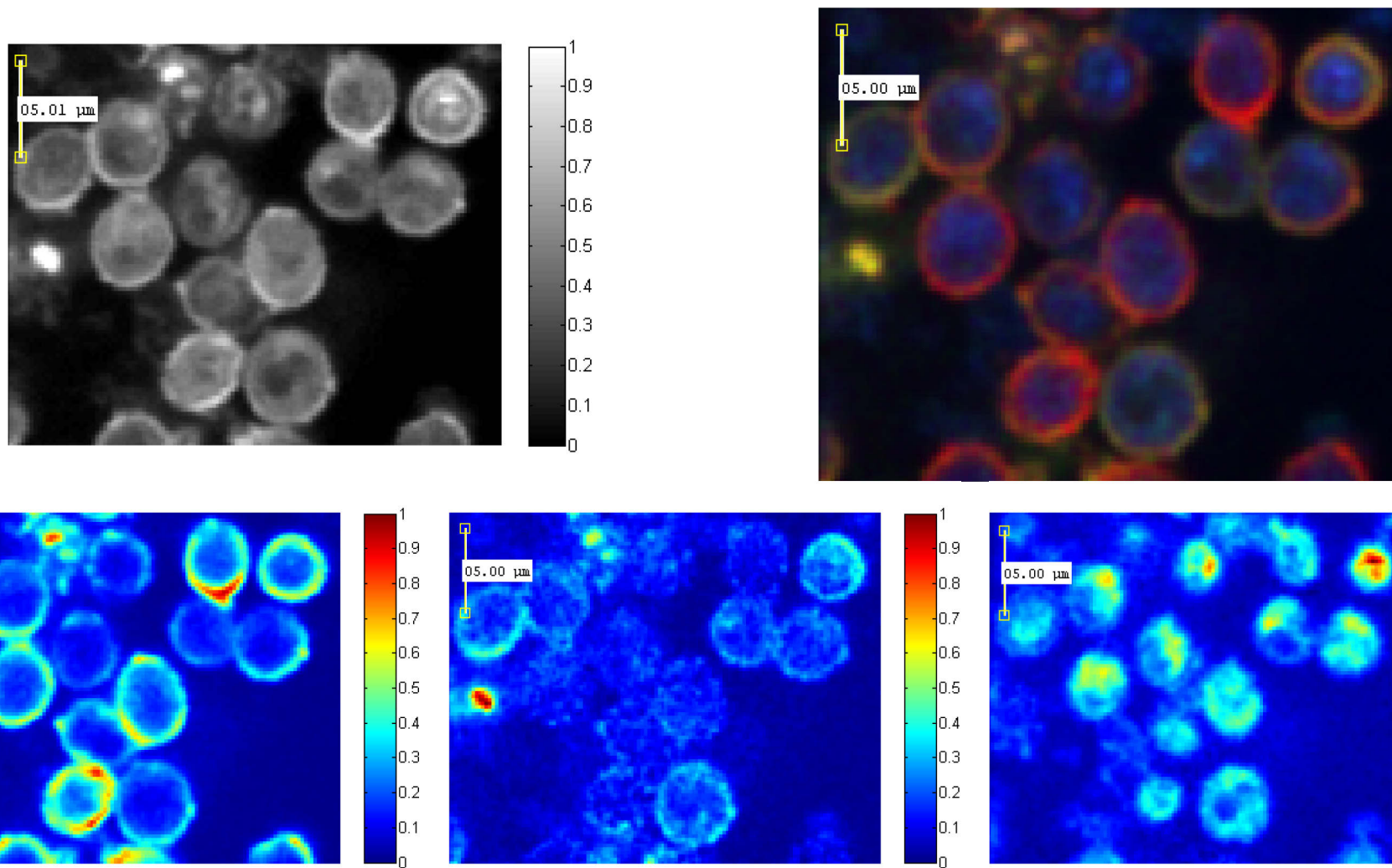


Abbildung 7.15: Zwei Wochen gelagert und anschließend gekeimte MEA-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

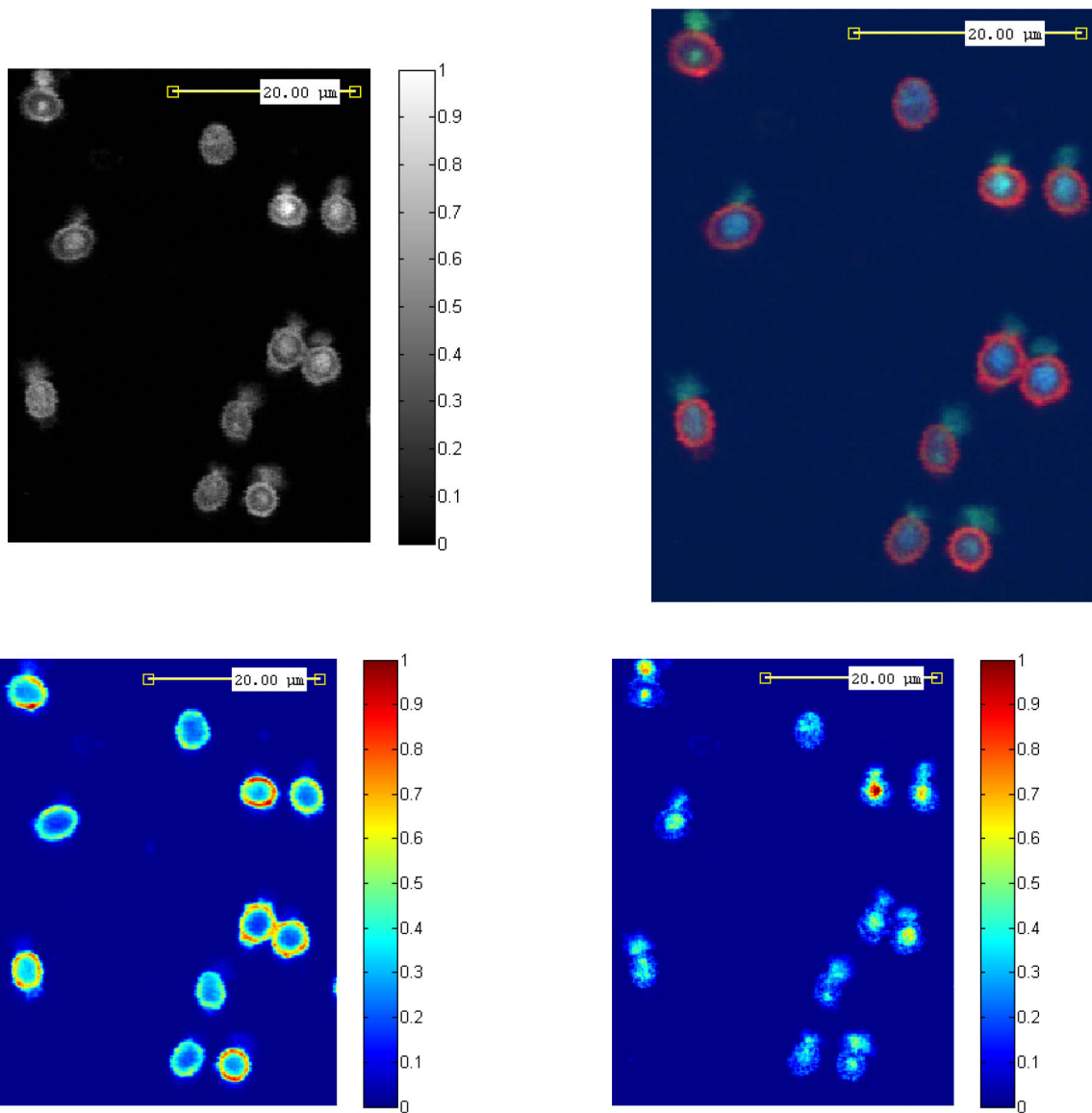


Abbildung 7.16: frisch geerntete-WK Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

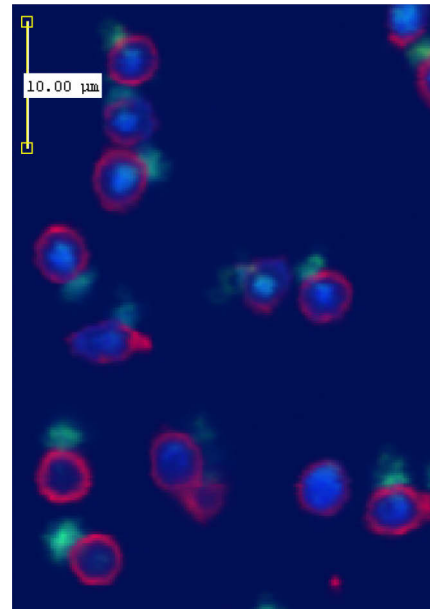
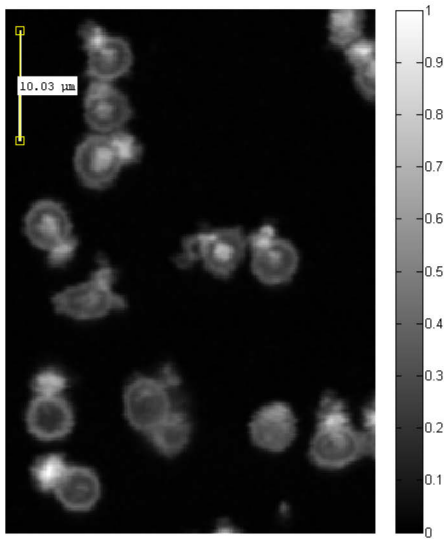
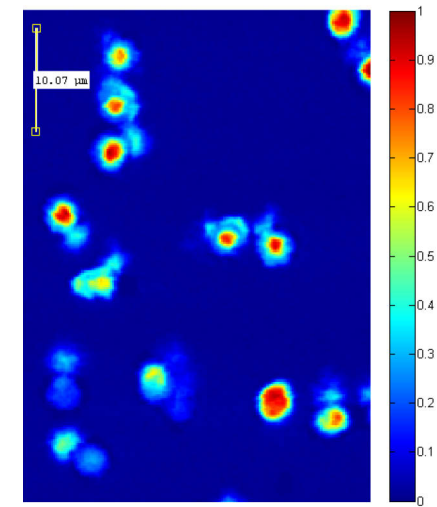
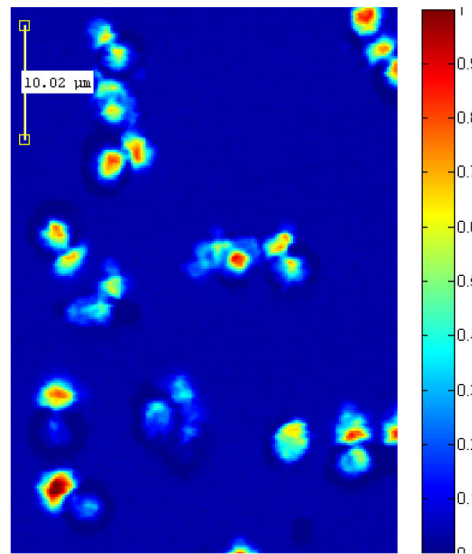
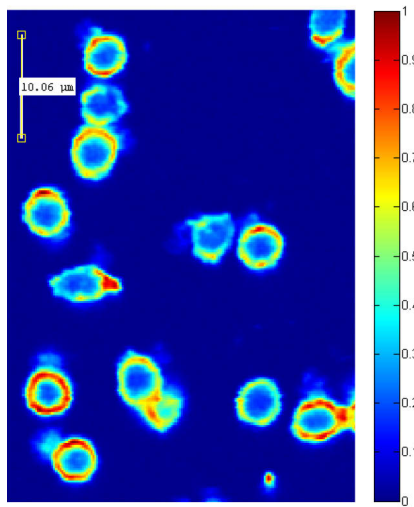


Abbildung 7.17: Zwei Wochen gelagerte WK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).



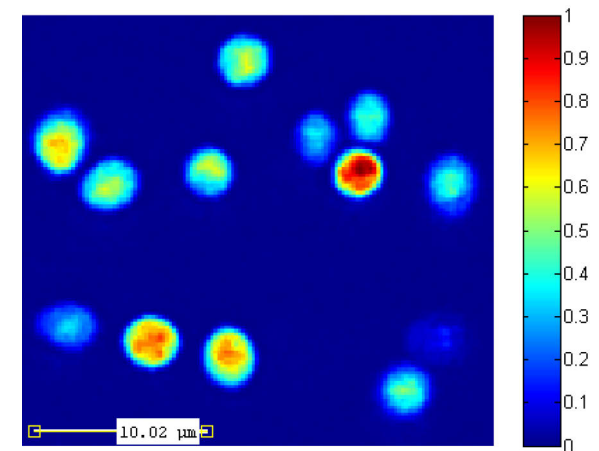
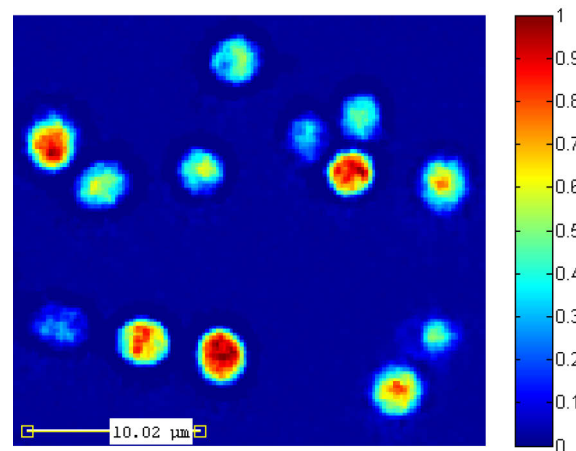
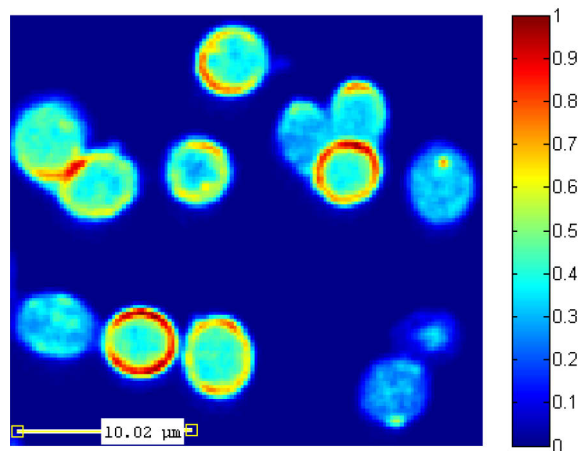
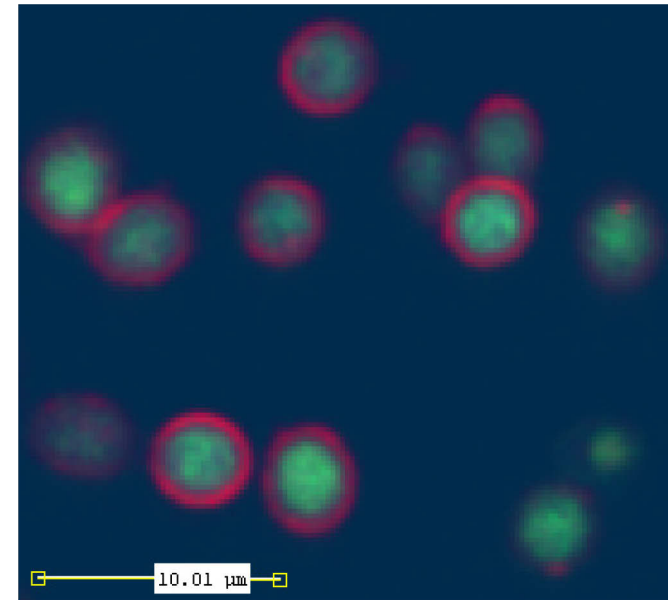
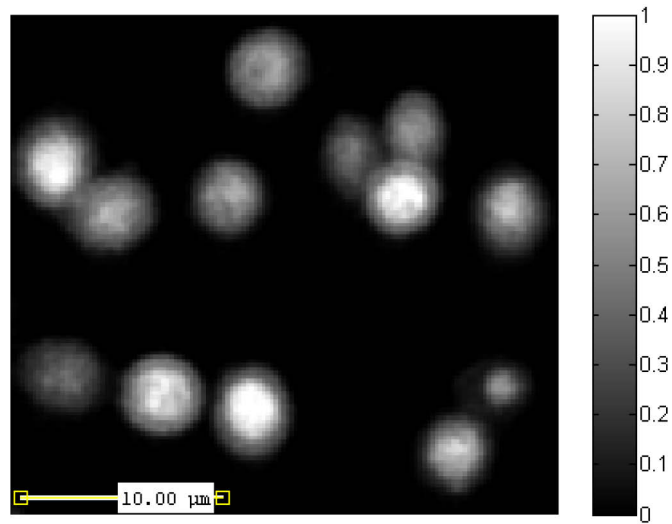


Abbildung 7.18: Abgetötete WK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

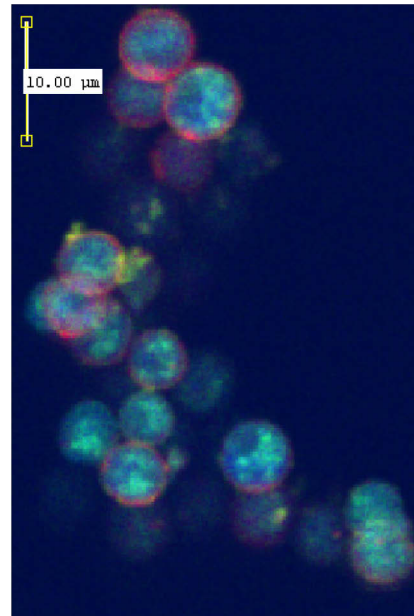
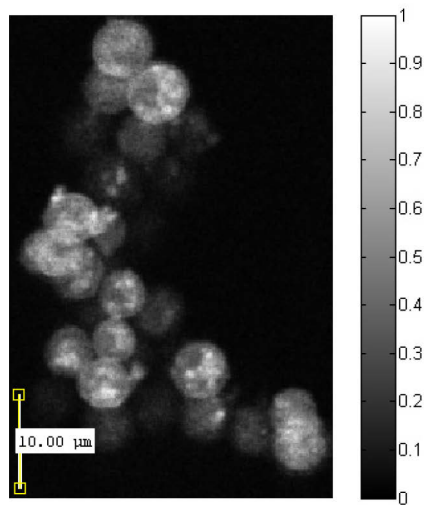
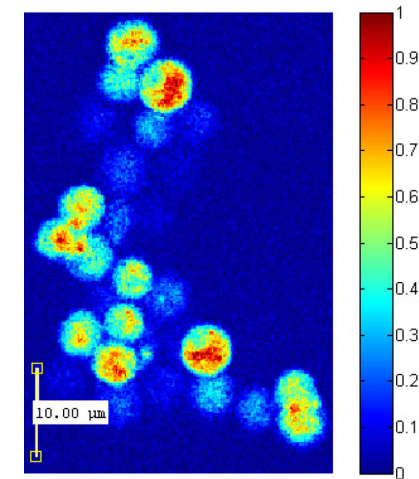
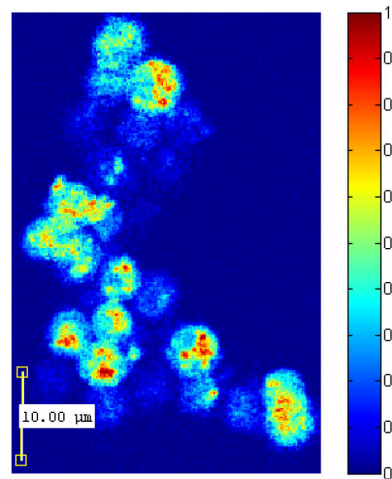
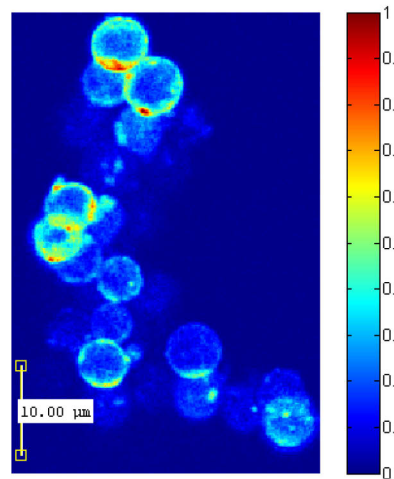


Abbildung 7.19: Frisch gekeimte WK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).



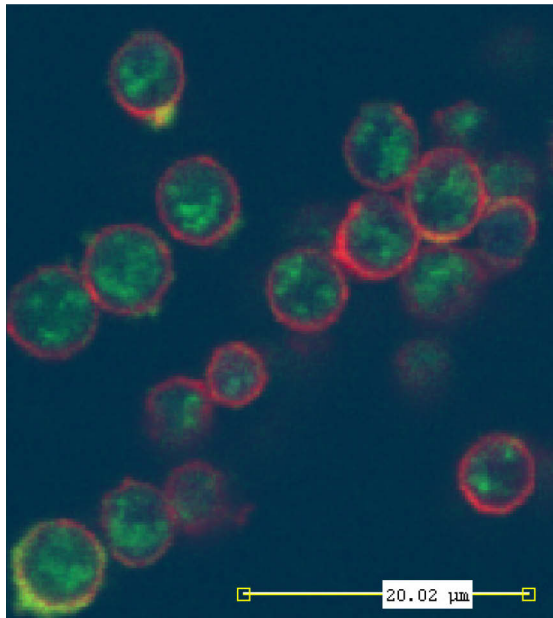
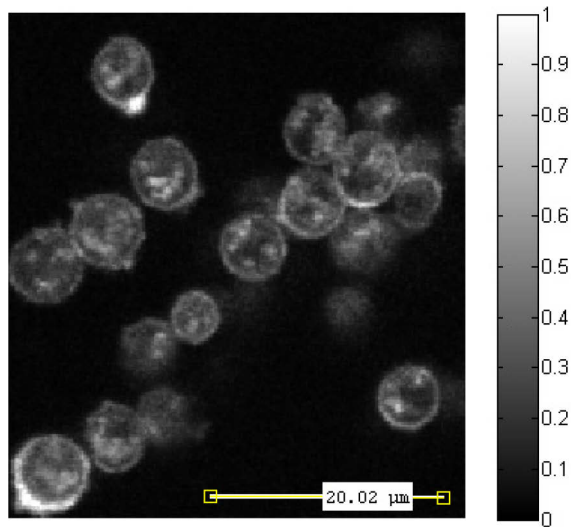


Abbildung 7.20: Zwei Wochen gelagert und anschließend gekeimte WK-Sporen; links oben: Intensitätsverteilung der Fluoreszenz; rechts oben: RGB-Darstellung der drei Lebensdauern τ_1 , τ_2 und τ_3 ; unten links: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_1 (Melanin); unten Mitte: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_2 (freies NADPH); unten rechts: Intensitätsverteilung der Lebensdauer τ_3 (enzymgebundenes NADPH).

